



INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
C.S.I.C. / UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

Homeostasis del zinc a pH alcalino y su relevancia en la
virulencia de *Aspergillus fumigatus*

Jorge Amich Elías

Dr. José Antonio Calera Abad, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada **“Homeostasis del zinc a pH alcalino y su relevancia en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*”**, presentada por D. Jorge Amich Elías para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extendiendo el presente certificado en Salamanca, a 13 de abril de 2010.

Fdo: José Antonio Calera Abad

Dr. Ángel Domínguez Olavarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada **“Homeostasis del zinc a pH alcalino y su relevancia en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*”**, presentada por D. Jorge Amich Elías para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Antonio Calera Abad en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido este certificado en Salamanca, a 13 de abril de 2010

Fdo: Ángel Domínguez Olavarri

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr Fernando Leal, con quien realicé mi primer “trabajo de investigación” cuando aún estaba en la carrera. Posteriormente tú fuiste quien confió en mí, ofreciéndome un sitio para trabajar en este grupo, muchas gracias por ello.

Por supuesto, quiero agradecer especialmente a mi director, el Dr José Antonio Calera, quien ha sido mi guía durante todo este tiempo. Gracias por enseñarme a hacer ciencia y por estar siempre disponible para resolver todas las dudas que han surgido a través de estos años.

También quiero dar las gracias al Dr. Jean-Paul Latgé y a toda la gente de su laboratorio en París. Fue una experiencia maravillosa trabajar esos tres meses allí con vosotros, ¡a pesar de que no aprendiera nada de francés!

Gracias a la Dra. Emilia Mellado (una amiga, no una jefa) y también a toda la gente del laboratorio de micología del Instituto Carlos III en Madrid. Fueron otros tres meses extraordinarios en los que conocí un poco el punto de vista médico de la ciencia.

Muchas gracias a todos los compañeros de trabajo aquí en el IMB. Ha sido un periodo largo en mi vida durante el cual todos me habéis ayudado de una forma u otra: jefes, personal técnico, becarios (“viejas glorias”, “compañeros de quinta” y “nuevas promesas”)... Todo el mundo está siempre dispuesto a prestar ayuda, y eso hace que el ambiente de trabajo sea fantástico. Mención especial merecen mis compañer@s de laboratorio: los que ya no están, los que han estado siempre y los que acaban de llegar. Entre todos habéis conseguido que el laboratorio sea como mi segunda casa. Por supuesto cabe destacar a una persona que desde el principio se convirtió en mucho más que una compañera o una amiga: muchas gracias Ana, sin duda soy afortunado de estar contigo, y más aún de que además de compartir la vida, también hayamos estado juntos en esta segunda casa.

Gracias a mis amigos. Hay muchísima gente a la que tendría que agradecer en este apartado y me siento dichoso por ello. Daos todos por aludidos ya que sabéis que formamos una gran familia todos juntos y que yo no sería la misma persona sin vosotros.

Gracias a mi padre, que siempre está ahí para todo lo que necesite.

Y, por supuesto, gracias a mi madre y a mi hermana que han sido y siempre serán mi mayor apoyo y mis mayores admiradoras.

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| 1. Biología de <i>Aspergillus fumigatus</i> en la naturaleza | 3 |
| 2. Virulencia de <i>A. fumigatus</i> | 4 |
| 3. Enfermedades causadas por <i>A. fumigatus</i> | 5 |
| 3.1. Diagnóstico de la aspergilosis pulmonar invasiva..... | 7 |
| 3.2. Quimioterapia de la aspergilosis pulmonar invasiva..... | 8 |
| 4. Funciones biológicas del zinc..... | 9 |
| 5. Importancia del zinc en la virulencia de <i>A. fumigatus</i> | 10 |
| 6. Homeostasis del zinc en células eucariotas..... | 11 |
| 6.1. Homeostasis de zinc en células humanas | 12 |
| 6.2. Homeostasis de zinc en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 14 |
| 7. Regulación de la expresión génica por pH en <i>Aspergillus</i> | 18 |
| 8. Homeostasis del zinc en <i>Aspergillus fumigatus</i> | 20 |
| 9. Objetivos del trabajo..... | 24 |

| | |
|-----------------|----|
| RESULTADOS..... | 25 |
|-----------------|----|

CAPÍTULO I:

| | |
|--|-----------|
| La represión del sistema ácido de adquisición de zinc ZrfA/ZrfB de <i>Aspergillus fumigatus</i> está mediada por el factor PacC en condiciones alcalinas limitantes en zinc | 29 |
| 1. Antecedentes..... | 29 |
| 2. Objetivo principal | 29 |
| 3. Objetivos experimentales específicos..... | 29 |
| 4. Resultados..... | 30 |
| 5. Información adicional..... | 31 |

CAPÍTULO II:

| | |
|--|-----------|
| La supervivencia de <i>Aspergillus fumigatus</i> en ambientes alcalinos extremadamente limitantes en zinc depende de la inducción de un sistema de homeostasis de zinc codificado por los genes <i>zrfC-aspf2</i> | 35 |
| 1. Antecedentes..... | 35 |
| 2. Objetivo principal | 35 |
| 3. Objetivos experimentales específicos..... | 35 |
| 4. Resultados..... | 36 |
| 5. Información adicional..... | 40 |

CAPÍTULO III:

| | |
|---|-----------|
| Importancia de la capacidad de adquisición de zinc a partir de medios alcalinos extremadamente limitantes en zinc en la virulencia de <i>Aspergillus fumigatus</i> ... | 45 |
| 1. Construcción de cepas prototróficas e isogénicas respecto a <i>pyrG</i> | 45 |
| 2. Crecimiento en suero | 46 |
| 3. Relevancia de la adquisición de zinc en germinación | 50 |
| 4. Importancia de <i>zrfC</i> en la virulencia de <i>A. fumigatus</i> | 52 |
| 5. Importancia de <i>aspf2</i> en la virulencia de <i>A. fumigatus</i> | 67 |

| | |
|-----------------|----|
| DISCUSIÓN | 69 |
|-----------------|----|

| | |
|--|----|
| 1. El sistema alcalino de adquisición de zinc..... | 72 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| 2. La capacidad de obtener zinc en la virulencia de <i>A. fumigatus</i> | 73 |
| CONCLUSIONES..... | 79 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 83 |
| 1. Microorganismos y medios de cultivo empleados..... | 85 |
| 1.1. Medios empleados para el cultivo de <i>E. coli</i> | 86 |
| 1.2. Medios empleados para el cultivo de <i>S. cerevisiae</i> | 86 |
| 1.3. Medios empleados para el cultivo de <i>A. fumigatus</i> | 86 |
| 1.4. Preparación y limpieza de recipientes para medios y cultivos..... | 87 |
| 2. Crecimiento de <i>A. fumigatus</i> | 87 |
| 3. Plásmidos utilizados para generar cepas mutantes..... | 88 |
| 4. Construcción y selección de cepas mutantes de <i>A. fumigatus</i> | 90 |
| 4.1. Obtención de protoplastos de <i>A. fumigatus</i> | 90 |
| 4.2. Transformación <i>A. fumigatus</i> | 91 |
| 4.3. Selección de mutantes de <i>A. fumigatus</i> | 92 |
| 4.4. Obtención de cepas <i>pyrG</i> ⁻ a partir de cepas mutantes <i>pyrG</i> ⁺ ectópicas..... | 92 |
| 5. Detección y manipulación de ácidos nucleicos..... | 93 |
| 5.1. Obtención de ADNg genómico de <i>A. fumigatus</i> y análisis por Southern-blot..... | 93 |
| 5.2. Obtención de ARN total de <i>A. fumigatus</i> y análisis por Northern-blot..... | 94 |
| 6. Ensayos de virulencia en un modelo murino de aspergilosis invasiva..... | 95 |
| 6.1. Determinación de la carga fúngica..... | 96 |
| 6.2. Comprobación de las cepas reaisladas de animales infectados..... | 97 |
| 6.3. Histología..... | 97 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 99 |



INTRODUCCIÓN

1. Biología de *Aspergillus fumigatus* en la naturaleza

Aspergillus fumigatus es un hongo filamentosos saprofita que crece y esporula en el suelo alimentándose de materia orgánica en descomposición. Gracias a su versatilidad metabólica y termotolerancia es capaz de colonizar hábitats muy diversos, por lo que presenta una distribución cosmopolita.

En la naturaleza *A. fumigatus* se reproduce normalmente mediante la producción de esporas asexuales uninucleadas o **conidios** (Fig. 1I). Cuando los conidios encuentran un ambiente adecuado germinan generando filamentos septados o **hifas**, que están constituidas por células multinucleadas haploides. Las hifas crecen por extensión apical y se ramifican lateralmente originando una masa densa de filamentos o **micelio**. A medida que el micelio se extiende, se van desarrollando las estructuras esporógenas denominadas **conidióforos**. Estos se forman a partir de ciertas células especializadas de las hifas o **células pie**, de las que emerge un tallo aéreo que se ensancha isodiamétricamente en su extremo apical formando una vesícula sobre la que se desarrollan los esterigmas o **fiálidas**. A partir de éstas se producen cadenas de conidios mediante gemaciones sucesivas. Los conidios son de muy pequeño tamaño (2-3 μm de diámetro), por lo que son fácilmente diseminados por el viento.

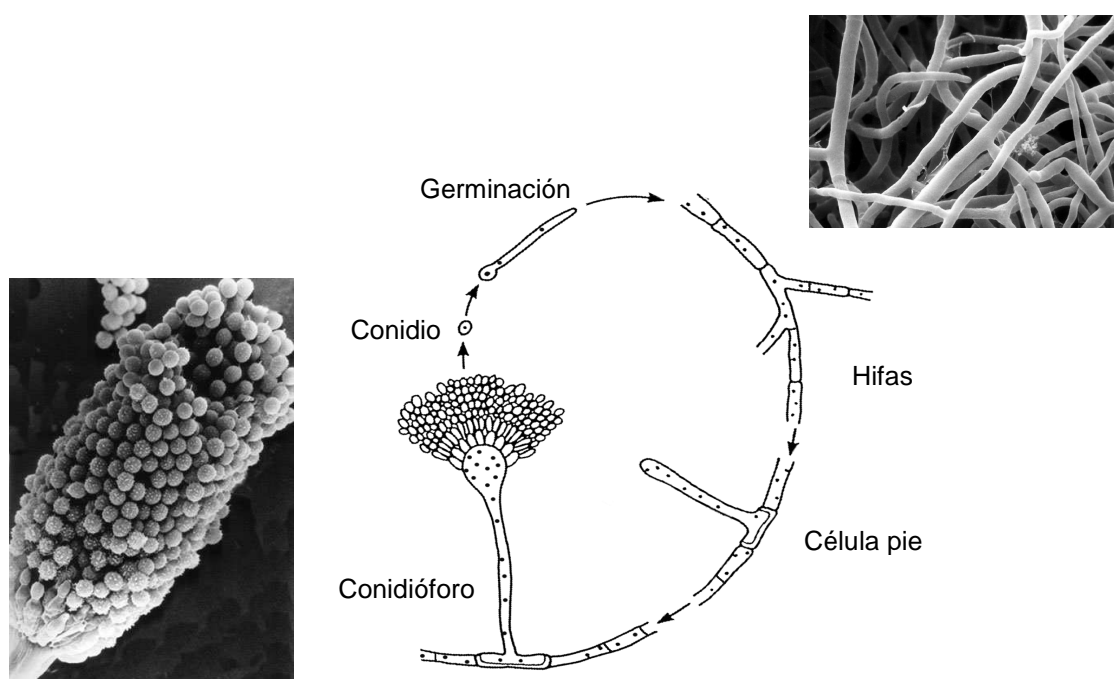


Fig. 1I. Ciclo de vida asexual de *A. fumigatus*.

Recientemente se ha descubierto que *A. fumigatus* posee ciclo sexual, perteneciendo en su forma teleomorfa al género *Neosartorya* (O'Gorman *et al.*, 2009). Sin embargo, este ciclo sexual no ha sido todavía observado en la naturaleza, por lo que se desconoce la frecuencia con la que realmente ocurre y la relevancia que puede tener en la biología del hongo.

2. Virulencia de *A. fumigatus*

Una característica propia de cualquier patógeno es su virulencia o capacidad relativa para causar daño al hospedador que parasita. Sin embargo, la virulencia de un microorganismo viene determinada por muchas variables que dependen de la relación patógeno-hospedador (Casadevall and Pirofski, 2001) y, en muchos casos, la virulencia es únicamente relevante en el contexto de la interacción con un hospedador susceptible. Por ejemplo, la virulencia de *A. fumigatus* **sólo puede ser comprendida considerando conjuntamente el estado inmune del hospedador** y ciertos atributos de virulencia del hongo (Latgé and Calderone, 2002; Tekaia and Latgé, 2005; Hohl and Feldmesser, 2007).

Respecto al estado inmune del hospedador, un individuo inmunocompetente dispone de tres líneas de defensa para eliminar el hongo y evitar que crezca en el tejido pulmonar. La primera de ellas está constituida por la acción de los cilios de la mucosa epitelial del tracto respiratorio, que impide que la mayoría de los conidios alcancen los alveolos pulmonares. Los conidios que alcanzan los alveolos pulmonares se encuentran con la segunda línea de defensa, los macrófagos alveolares, que los fagocitan y destruyen mediante un proceso dependiente de especies reactivas del oxígeno (ROS). Este proceso es sorprendentemente lento, por lo que algunos conidios son capaces de germinar. Se produce entonces el reclutamiento de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), que constituyen la tercera línea de defensa y que se encargan de destruir las hifas en crecimiento mediante la secreción de ROS y de enzimas líticas (Latgé, 2003). Más recientemente se ha descrito que el reclutamiento temprano de neutrófilos también es capaz de inhibir la germinación de los conidios por un proceso independiente de ROS (Bonnett *et al.*, 2006). Por tanto un hospedador solamente será susceptible de ser invadido por *A. fumigatus* si se encuentra inmunosuprimido (Stergiopoulou *et al.*, 2007)

Respecto al patógeno, *A. fumigatus* presenta varias características biológicas que le capacitan para crecer dentro de un hospedador susceptible (Tekaia and Latgé, 2005; Hohl and Feldmesser, 2007):

1. Los conidios son lo bastante pequeños (2-3 μm) para alcanzar fácilmente los alveolos pulmonares.
2. Presenta una gran versatilidad metabólica y es capaz de obtener nutrientes a pH fisiológico.
3. Está equipado para protegerse frente a cambios de potencial redox por medio de diferentes clases de melaninas, oxidorreductasas, superóxido dismutasas y catalasas.

4. Es un hongo termófilo que exhibe una tasa de crecimiento mayor a 37°C que a 28°C, un requisito indispensable para crecer de forma rápida y óptima a la temperatura corporal de mamíferos.

El hecho de que especies relativamente cercanas de *Aspergillus*, como *Neosartorya fischeri*, *A. oryzae* y *A. nidulans*, presenten características biológicas similares pero no sean patógenas, o al menos mucho menos virulentas, ha promovido la búsqueda de **factores de virulencia** específicos en el genoma de *A. fumigatus*. En el sentido más estricto, tradicionalmente se ha definido “factor de virulencia” a cualquier componente de un patógeno cuya eliminación suprime específicamente la virulencia del mismo pero no su capacidad de crecimiento fuera del hospedador (Casadevall and Pirofski, 2001; Latgé and Calderone, 2002). Sin embargo, no se ha hallado hasta la fecha ningún factor que cumpla estas directrices, lo que sugiere que la virulencia de *A. fumigatus* es un fenómeno multifactorial (Latgé, 2001; Rementeria *et al.*, 2005). Más aún, a excepción de algunos patógenos, en la mayoría de los casos no es posible identificar factores de virulencia en el sentido estricto del término. Por esta razón, Casadevall y Pirofski (2001) propusieron que un factor de virulencia debería definirse como cualquier componente de un patógeno que dañe al hospedador, pudiendo incluir componentes esenciales para la viabilidad del microorganismo. En cualquier caso, tras el análisis de la secuencia de ADN genómico de *A. fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005) se han encontrado más de 500 posibles genes sin ortólogos en *A. nidulans* ni *A. oryzae* y más de 700 genes ausentes o divergentes en *N. fischeri*, por lo que tal vez algunos de ellos podrían determinar la virulencia de *A. fumigatus*.

3. Enfermedades causadas por *A. fumigatus*

El principal portal de entrada de las esporas de *A. fumigatus* en el hombre son las vías respiratorias. Los conidios son inhalados constantemente y gracias a su pequeño tamaño alcanzan fácilmente los espacios alveolares del pulmón (Latgé, 1999). Como se ha comentado anteriormente, la inhalación de esporas no suele tener consecuencias en individuos sanos. No obstante, si el inóculo es muy elevado o si el individuo está inmunocomprometido el hongo puede causar daños al hospedador. Las enfermedades causadas por *A. fumigatus* se denominan de forma genérica **aspergilosis**. No resulta sencillo realizar una clasificación totalmente satisfactoria de las aspergilosis, ya que existen diversos factores que se pueden tomar en cuenta para su confección. A pesar de ello, teniendo en cuenta las particularidades anatomopatológicas y clínicas de la enfermedad, las aspergilosis se pueden clasificar en tres categorías principales: alérgicas, por colonización saprofítica e invasivas (Latgé, 1999; Muñoz *et al.*, 2006).

Las **enfermedades alérgicas** son el resultado de una respuesta hipersensible a las moléculas de la pared de la spora. Ocurren en pacientes que sufren de asma, de fibrosis

quística o incluso en personas sanas expuestas a inhalar repetidamente altas cantidades de conidios. Existen distintos tipos de enfermedades alérgicas entre las que se encuentran el asma alérgico, la rinitis alérgica y el aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).

Las **enfermedades por colonización saprofítica** ocurren cuando el hongo es capaz de crecer dentro de las vías respiratorias sin llegar a dañar el tejido circundante. Este crecimiento se debe a la naturaleza saprofita del hongo, aunque puede llegar a producir enfermedades como el **aspergiloma pulmonar (micetoma o bola fúngica)** que se produce cuando el hongo crece en cavidades pulmonares preexistentes formadas por enfermedades tales como la tuberculosis, la sarcoidosis o la bronquiectasia. El aspergiloma consiste en una masa de hifas fúngicas entremezcladas con una cantidad variable de restos mucosos y celulares que puede llegar a desarrollar conidióforos si existe un espacio que contenga aire. Muchos de los pacientes de aspergiloma son asintomáticos. Cuando aparecen síntomas, el más común es la hemoptisis o ruptura de los vasos sanguíneos adyacentes, pudiendo llegar a ser masiva y fatal (Al-Alawi *et al.*, 2005; Zmeili and Soubani, 2007). La bola fúngica también puede formarse en las cavidades sinusales, principalmente en la maxilar (Grosjean and Weber, 2007), aunque en este caso la extracción mediante cirugía endoscópica sinusal permite una fácil eliminación del micetoma sin riesgo para el paciente (Pagella *et al.*, 2007).

Las **enfermedades invasivas** se consideran prácticamente exclusivas de pacientes inmunocomprometidos (Stevens, 2004). Por tanto, todas aquellas circunstancias que produzcan un estado de inmunosupresión en el individuo determinan factores de riesgo que predisponen para el desarrollo de una aspergilosis invasiva. Entre estos factores figuran la neutropenia, el trasplante de médula ósea o de otros órganos, las enfermedades crónicas subyacentes (leucemias agudas, fibrosis quística, diabetes, fases avanzadas de SIDA, etc...), granulocitopenia, neoplasias hematológicas y terapias prolongadas con corticosteroides o con drogas citotóxicas (Zmeili and Soubani, 2007).

Existen diversas localizaciones en las que se pueden desarrollar aspergilosis invasivas, entre ellas son relativamente frecuentes las aspergilosis traqueobronquial, sinusal y cutánea. No obstante, la **aspergilosis pulmonar invasiva** es la presentación más común de las enfermedades invasivas (Muñoz *et al.*, 2006). Esta enfermedad se caracteriza por la germinación de los conidios y crecimiento de las hifas en los pulmones, produciendo destrucción tisular, hemorragia pulmonar y obstrucción microvascular (Zaas and Alexander, 2009). Debido a la ruptura de los vasos sanguíneos frecuentemente ocurre la diseminación hematógena del hongo, que puede entonces desarrollarse en prácticamente cualquier órgano, dando lugar a las **aspergilosis diseminadas**. El cerebro es habitualmente el órgano más afectado (aproximadamente el 50% de los casos) provocando abscesos, hemorragias y meningitis cerebrales, con lo que resulta mortal en más del 90% de los casos (Muñoz *et al.*, 2006). También se puede dar la diseminación hacia el tracto gastrointestinal, hígado, bazo, corazón, ojos, huesos o articulaciones (Montejo, 2002).

El aumento del número y de la efectividad de terapias inmunosupresoras administradas en la actualidad para combatir diversas patologías, está resultando en un incremento de los

casos de infecciones producidas por *A. fumigatus*, aproximándose o incluso superando a los casos de candidiasis en determinados grupos de pacientes (Pagano *et al.*, 2006; Pfaller and Diekema, 2007). Además de este aumento de la incidencia de la API en los países desarrollados, esta enfermedad presenta una **tasa de mortalidad** muy elevada, que puede llegar hasta el 90% en pacientes de alto riesgo (Singh and Paterson, 2005; Del Bono *et al.*, 2008). Esta elevada mortalidad se debe principalmente a la dificultad de realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad y a la relativa ineficacia de los agentes quimioterapéuticos utilizados en su tratamiento.

3.1. Diagnóstico de la aspergilosis pulmonar invasiva

El diagnóstico temprano de la API continúa suponiendo un reto importante para el tratamiento eficaz de la enfermedad, puesto que anticipar el inicio de la terapia antifúngica constituye uno de los factores fundamentales para la supervivencia del paciente. Sin embargo, debido a que los síntomas de la API son inespecíficos es muy difícil realizar con precisión un diagnóstico temprano. Además, el inmunodiagnóstico no es viable debido al estado de inmunosupresión del individuo, el crecimiento en cultivo de muestras no estériles (ej. esputo) es poco sensible y la obtención invasiva de muestras tisulares estériles (ej. biopsia) no está recomendada debido al delicado estado de los pacientes (Singh and Paterson, 2005; Del Bono *et al.*, 2008). Por todo esto, actualmente el diagnóstico se realiza mediante la detección de moléculas circulantes en fluidos biológicos. En particular, se realiza la detección de galactomanano, bien sea en suero, en lavados broncoalveolares o en orina, utilizando un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce específicamente el galactomanano (GM) de *A. fumigatus* mediante un ensayo ELISA (Platelia® Aspergillus, Bio-Rad Laboratories) (Klont *et al.*, 2004; Wheat and Walsh, 2008). También se realiza la detección en suero del $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucano de la pared celular del hongo por ensayo de coagulación (Fingitec G-test MK) o colorimétrico (Wako, Richmond) (Obayashi *et al.*, 2008; Senn *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque estos métodos han mejorado el diagnóstico de la enfermedad, pueden presentar falsos positivos por reactividad cruzada con otros hongos y/o con antibióticos β -lactámicos y no siempre son lo suficientemente sensibles (Del Bono *et al.*, 2008). Por tanto, a pesar de ser los métodos más utilizados en la actualidad, no son totalmente fiables para el diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte, la técnica de PCR para la detección de la API se encuentra en estudio en diversos laboratorios a lo largo de todo el mundo, mostrando un buen pronóstico para su utilización en el futuro, aunque antes es necesaria una estandarización del procedimiento para su uso rutinario, ya que las variaciones entre diversos estudios son demasiado amplias (Mengoli *et al.*, 2009).

3.2. Quimioterapia de la aspergilosis pulmonar invasiva

Los pacientes con API que no son tratados o que, debido a un diagnóstico tardío, comienzan a recibir tratamiento cuando la enfermedad está ya muy avanzada, presentan una mortalidad cercana al 100% cualquiera que sea el antifúngico que les sea administrado (Tabla 1I).

En la actualidad el **voriconazol** es el tratamiento primario de elección frente a la API (Herbrecht *et al.*, 2002). Como tratamientos de rescate se pueden también administrar anfotericina-B o caspofungina. Sin embargo, cualquiera de estos tratamientos aunque se administren a pacientes que han recibido un diagnóstico temprano, resultan poco eficaces según se desprende de las elevadas tasas de mortalidad (30% para voriconazol, 42% para anfotericina-B y 55% para caspofungina) (Singh and Paterson, 2005).

Tabla 1I. Antifúngicos empleados en el tratamiento de las aspergilosis invasivas.

| ANTIFÚNGICO | ESTRUCTURA | DIANA | MODO DE ACCIÓN | EFECTO | OBSERVACIONES |
|------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|----------|------------------------------------|
| ITRACONAZOL | Azol | Membrana plasmática | Inhiben síntesis ergosterol | Estático | Interacción con otros tratamientos |
| VORICONAZOL | | | | | |
| ANFOTERICINA-B | Polieno | | Forma poros | Lítico | Nefrotoxicidad |
| CASPOFUNGINA | Equinocandina | Pared celular | Inhibe síntesis glucano | Cida | Terapia de salvamento |
| 5-FLUOROCITOSINA | Análogo de nucleótidos | ADN, ARN | Inhibe síntesis ADN y traducción | Cida | Usada en tratamientos combinados |

Estos elevados porcentajes de mortalidad ponen claramente de manifiesto la necesidad de encontrar drogas más eficaces contra *A. fumigatus*. A pesar del notable esfuerzo realizado en los últimos años, ninguno de los nuevos compuestos descubiertos ha resultado totalmente efectivo. Por tanto, se sigue considerando un reto el descubrimiento de nuevos antifúngicos frente a *A. fumigatus* y, por consiguiente, la búsqueda de nuevas dianas moleculares sobre las que poder desarrollar esos compuestos. Precisamente, entre esas nuevas dianas se pueden incluir las proteínas relacionadas con la obtención de oligoelementos a partir del hospedador. Se ha demostrado que la concentración de metales libres en los tejidos es extremadamente baja, puesto que se hallan mayoritariamente unidos a proteínas que los acumulan, transportan o de las que forman parte estructural. Por tanto, los microorganismos patógenos, que deben obtener de los tejidos del hospedador todos los nutrientes que necesitan han desarrollado sistemas especializados para ser capaces de captar estos micronutrientes esenciales. Por ejemplo, se ha demostrado que la adquisición de hierro *in vivo* es necesaria para la virulencia de *Candida albicans* (Ramanan and Wang, 2000) y de *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004; Hissen *et al.*, 2005).

4. Funciones biológicas del zinc

Los **oligoelementos** o **micronutrientes** son elementos esenciales que se necesitan en cantidades muy pequeñas, pero que son fundamentales para el crecimiento y desarrollo de los organismos. De entre todos los micronutrientes, el zinc es el segundo más abundante en las células eucariotas, siendo superado solamente por el hierro (Coleman, 1992). A pesar de encontrarse en menor cantidad, el zinc es componente esencial de muchas más proteínas que el hierro (Barret *et al.*, 1992; Maret *et al.*, 2001). El zinc es necesario para la estabilidad y/o función catalítica de más de 300 metaloenzimas y de otras proteínas (Kaim and Schwederski, 1994; Auld, 2001). De hecho, el zinc es el único metal presente en las seis clases de enzimas establecidas por la IUB (*International Union of Biochemistry*). La gran diversidad de enzimas que contienen Zn^{2+} pone de manifiesto que éste es necesario en muchas reacciones de síntesis y degradación de glúcidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

El zinc puede tener función **estructural**, **catalítica** o **cocatalítica** en las proteínas, formando distintos tipos de enlaces en cada una de ellas (Auld, 2001). Cuando actúa como estabilizador estructural establece cuatro enlaces de coordinación con ciertos residuos peptídicos, preferentemente cisteínas, estabilizando la estructura de la enzima o del sustrato. Cuando tiene función catalítica participan en el enlace una molécula de agua y tres residuos peptídicos, de los cuales el preferido suele ser histidina. En este caso el Zn^{2+} polariza enlaces relevantes del sustrato con el fin de activarlo y facilitar la reacción. En muchas ocasiones esta polarización es necesaria para que las reacciones puedan ocurrir a pH fisiológico. Cuando actúa en cocatálisis dos o más átomos de Zn^{2+} se unen al mismo residuo (que puede ser aspartato, glutamato o histidina) o a una molécula de agua, de manera que los átomos se encuentran muy próximos entre sí y actúan como una única unidad catalítica. Estas unidades catalíticas también pueden estar formadas por un átomo de zinc y otro átomo de un metal diferente.

Entre las principales funciones en las que participa el zinc se encuentran las que desempeña en la **replicación**, **transcripción**, **expresión génica** y **diferenciación celular**. Esto es debido a que el Zn^{2+} es necesario para la actividad de todas las polimerasas de ácidos nucleicos y de los factores de transcripción que poseen dominios tipo *zinc-finger* de unión a ADN presente en una amplia variedad y elevado número de factores de transcripción de eucariotas. Por tanto, la deficiencia de zinc afectará en gran medida a la capacidad de **crecimiento**, **desarrollo** y **diferenciación** de todos los organismos vivos (Prasad, 1993).

5. Importancia del zinc en la virulencia de *A. fumigatus*

Aspergillus fumigatus es capaz de crecer en los tejidos de un hospedador susceptible. No obstante, para poder crecer, *A. fumigatus* debe ser capaz de obtener todos los nutrientes necesarios del medio, incluyendo micronutrientes esenciales como el hierro y el zinc. Sin embargo, la disponibilidad de micronutrientes en los tejidos vivos se mantiene a concentraciones tan bajas que son insuficientes para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (no patógenos). Además, tanto el hierro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) como el zinc (Zn^{2+}) en estado libre son tóxicos para las células (Kambe *et al.*, 2004; Papanikolaou and Pantopoulos, 2005). Por esta razón, casi todo el $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ del hospedador está asociado a hemoproteínas u otras ferroproteínas (transferrina y lactoferrina), de manera que la concentración de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ libre se ha estimado que es $\sim 10^{-12}$ μM (Bullen *et al.*, 2006). Por su parte, casi todo el Zn^{2+} del hospedador se encuentra unido a una gran cantidad de enzimas, factores de transcripción y metalotioneinas (MTs) que controlan la concentración de zinc disponible y también proteínas plasmáticas que unen Zn^{2+} (Auld, 2001; Tapiero and Tew, 2003). Por ejemplo, la concentración fisiológica del Zn^{2+} en plasma es 12-16 μM pero la inmensa mayoría se encuentra fuertemente unido a albúmina, α_2 -macroglobulina y transferrina por lo que se ha estimado que la concentración de zinc libre (Zn^{2+}) en plasma es $\sim 10^{-4}$ μM (Tapiero and Tew, 2003; Laggner *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha comprobado en nuestro laboratorio que la concentración mínima de Fe^{3+} y Zn^{2+} que se requiere para el crecimiento óptimo de una cepa silvestre de *A. fumigatus* (AF14) en un medio definido a pH fisiológico (pH 7.5) es ~ 1.0 μM (datos no publicados). Por tanto, resulta que **la concentración estimada de Fe^{3+} y Zn^{2+} libre en plasma es 10^{12} y 10^4 veces menor, respectivamente, que la mínima cantidad requerida para el crecimiento óptimo de *A. fumigatus*.** Esto sugiere que *A. fumigatus*, como otros patógenos, debe haber desarrollado ciertos mecanismos para obtener hierro y zinc a partir de los tejidos del hospedador. Otro factor a tener en cuenta es que, en respuesta a la infección, el hospedador ha desarrollado mecanismos para limitar la biodisponibilidad de hierro y zinc al patógeno. Por ejemplo, tanto la respuesta inflamatoria como un elevado contenido de hierro en el organismo inducen la expresión hepática del péptido **hepcidina**, que además de poseer acción antimicrobiana, disminuye la absorción de hierro por los enterocitos (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005). De la misma manera, los neutrófilos producen **calprotectina**, una proteína que une zinc y que se encuentra en gran cantidad en el fluido de abscesos. Además, los niveles plasmáticos de calprotectinas se incrementan hasta 130 veces durante el curso de infecciones pulmonares severas. Esta proteína inhibe el crecimiento microbiano al competir con los patógenos por el zinc (Striz and Trebichavsky, 2004). Por tanto, los tejidos del hospedador constituyen un ambiente extremadamente limitante en micronutrientes, así que la habilidad para obtenerlos puede influir en la virulencia de *A. fumigatus* más de lo esperado. En concordancia con esto, un estudio ha demostrado que la administración de EDTA (quelante de hierro, zinc y otros metales) junto con antifúngicos

estándar reduce significativamente la tasa de mortalidad en un modelo de API en roedores (Hachem *et al.*, 2006).

En relación a la obtención de estos micronutrientes esenciales, la captación de hierro por microorganismos patógenos ha sido tradicionalmente muy estudiada (Schaible and Kaufmann, 2004; Sutak *et al.*, 2008), incluyendo hongos patógenos como *Candida albicans* (Ramanan and Wang, 2000), *Cryptococcus neoformans* (Jung *et al.*, 2009) y *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004; Hissen *et al.*, 2005). Por el contrario, la importancia de la captación de zinc en la virulencia de hongos patógenos ha sido completamente ignorada hasta que recientemente se demostró que la regulación de la homeostasis del zinc es determinante en la capacidad patogénica de *A. fumigatus* (Moreno *et al.*, 2007b).

6. Homeostasis del zinc en células eucariotas

La cantidad total de zinc que una célula necesita para su crecimiento óptimo se denomina **cuota de zinc** (Eide, 2006). Este valor varía dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, la cuota de zinc de las levaduras es aproximadamente de 10^7 átomos de zinc por célula, mientras que en muchas células de mamíferos está en torno a 10^8 átomos de zinc por célula. Aunque estas cantidades difieren mucho cuantitativamente, si se considera el volumen celular se observa una gran similitud en la **concentración de zinc** que requieren los distintos tipos celulares, posiblemente debido a la conservación de las funciones del zinc en la bioquímica celular (Eide, 2006).

Dada la importancia del zinc en los procesos metabólicos de la célula, tanto su exceso como su déficit pueden tener efectos dramáticos en la fisiología celular. Cuando la concentración de zinc desciende por debajo de un valor mínimo, el crecimiento celular se detiene. Por el contrario, un exceso de zinc puede resultar tóxico para las células al inactivar proteínas interaccionando con sus sitios activos (Gaither and Eide, 2001). Por ello, las células están dotadas de un sistema para regular la homeostasis del zinc. Este sistema está formado por:

- 1) **Transportadores de zinc de la familia ZIP (*Zrt*-, *Irt*-like *Proteins*)**. Se encuentran principalmente en la membrana plasmática. La mayoría de las proteínas de esta familia poseen 8 dominios transmembrana. Los extremos N- y C-terminales están localizados hacia el espacio extracelular de la membrana plasmática o hacia el interior del orgánulo. Entre los dominios transmembrana III y IV tienen una región citoplasmática extensa rica en histidinas, que probablemente esté implicada en el transporte de zinc o en su regulación (Fig. 2Ia). Los transportadores ZIP bombean zinc y/u otros metales desde el espacio extracelular (o el interior de ciertos orgánulos) hacia el citoplasma, probablemente mediante un antiportador $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Balaji and Colvin, 2005). Existen cuatro subfamilias de proteínas ZIP: subfamilia I (agrupa fundamentalmente proteínas de plantas y hongos), subfamilia II (un pequeño grupo de proteínas de mamíferos y

nematodos), subfamilia *gufA* (incluye proteínas de procariotas y de eucariotas) y la subfamilia *LIV-1* (exclusiva de eucariotas) (Gaither and Eide, 2001; Eide, 2006).

- 2) **Transportadores de zinc de la familia CDF (*Cation Diffusion Facilitator*)**. Se encuentran principalmente en la membrana de orgánulos. Se caracterizan por tener seis dominios transmembrana, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol. Al igual que las proteínas ZIP poseen una extensa región citoplasmática entre los dominios transmembrana IV y V (Fig. 2Ib). Estas proteínas transportan zinc y/u otros metales desde el citoplasma hacia el lumen del orgánulo o el exterior celular y participan en la detoxificación y/o acúmulo de metales. Parece ser que este flujo es realizado gracias a un antiportador $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Colvin *et al.*, 2000; Ohana *et al.*, 2009). Tradicionalmente se han clasificado en tres subfamilias (I, II y III) en base a la similitud de las secuencias de aminoácidos (Gaither and Eide, 2001; Eide, 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación en base al metal que transportan, formando las subfamilias: Fe/Zn-CDF, Mn-CDF y Zn-CDF (Montanini *et al.*, 2007).
- 3) **Metalotioneínas quelantes de zinc (MTs)**. Son proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de cisteínas y muy bajo o nulo de histidinas y aminoácidos aromáticos. Tienen una gran variedad en secuencias, aunque siempre poseen características estructurales que les permiten unirse fuertemente a metales (particularmente Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}). Las MTs participan en la homeostasis del zinc mediante la donación/secuestro de zinc y/o control redox, controlando así el proceso de detoxificación y regulando el metabolismo (Palmiter, 2004).
- 4) **Factores de transcripción**. Siempre ha de existir al menos un factor regulador que active o inhiba la expresión de los genes relacionados con la homeostasis del zinc en función de la concentración ambiental de este metal (Gaither and Eide, 2001). Adicionalmente, pueden existir otros factores reguladores que interactúen con él para modular la expresión de los genes diana respondiendo a otros factores ambientales distintos a la disponibilidad de zinc, pero que afectan a la biodisponibilidad de zinc. Un ejemplo de esto es la regulación por pH que presentan los transportadores ZIP de *A. fumigatus* (Vicente-franqueira *et al.*, 2005).

6.1. Homeostasis de zinc en células humanas

En las células humanas se han identificado hasta la fecha 14 genes que codifican transportadores de la familia ZIP (Zip1-Zip14) (Lichten and Cousins, 2009), 10 genes que codifican transportadores de la familia CDF (ZnT1-ZnT10) (Lichten and Cousins, 2009), 4 que codifican metalotioneínas (MTI-MTIV) (Laity and Andrews, 2007) y un factor regulador (MTF-1) (Adams *et al.*, 2002).

La proteína **MTF-1** es un factor de transcripción que se expresa en todos los tipos celulares. En su extremo amino presenta un dominio de unión a ADN formado por seis *zinc fingers* que le permite unirse a los elementos de respuesta a metales (MRE), presentes en los promotores de los genes que regula. La secuencia consenso de estos elementos es

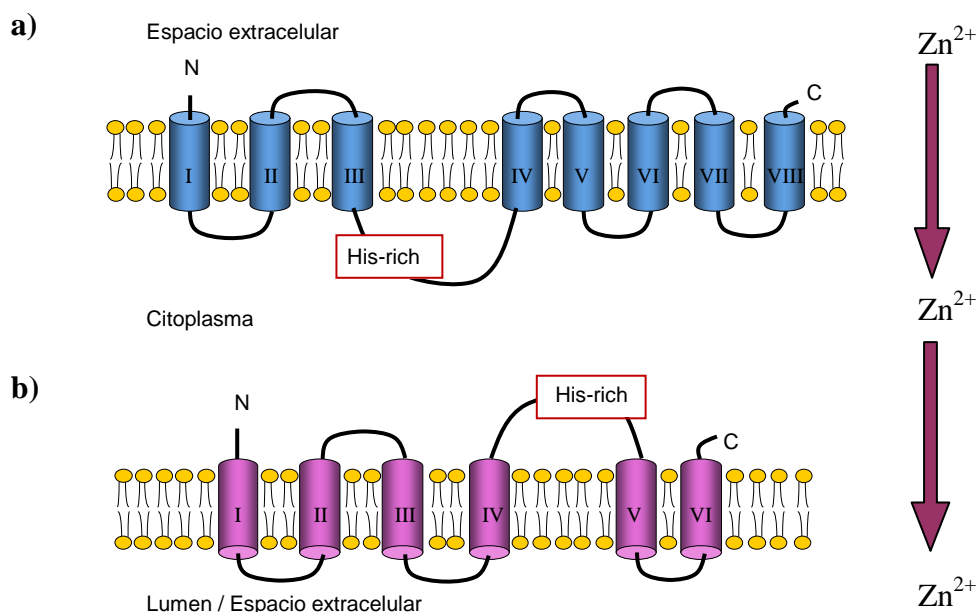


Fig. 2I: Proteínas de la familias ZIP y CDF. Las proteínas ZIP (a) generalmente poseen ocho dominios transmembrana (I-VIII) y una región citoplasmática rica en histidinas entre los dominios III y IV. Estos transportadores siempre bombean zinc hacia el citoplasma. Las proteínas CDF (b) tienen seis dominios transmembrana (I-VI) y una región citoplasmática rica en histidinas. Estas proteínas siempre bombean zinc fuera del citoplasma, bien sea hacia el exterior celular o hacia el lumen de un orgánulo.

5'-TGCRCnCGCCC-3' (Laity and Andrews, 2007). MTF-1 se activa en presencia de una alta concentración de zinc y se inactiva cuando ésta disminuye por debajo de un mínimo, de manera que activa la transcripción de genes relacionados con la homeostasis del zinc en respuesta a una elevada cantidad de zinc en las células. Entre los genes que regula figuran los que codifican las metalotioneinas MT-I y MT-II (relacionadas con el secuestro de zinc) y el transportador ZnT1 (encargado de la expulsión de zinc fuera de la célula) (Jackson *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha descrito que el regulador activo reprime la expresión del gen que codifica el transportador Zip10 (Wimmer *et al.*, 2005). Por tanto, la regulación transcripcional realizada por este factor es más compleja de lo que inicialmente parecía y aún queda mucho por desentrañar sobre su funcionamiento.

Los genes regulados por el factor MTF-1 se expresan en todos los tipos celulares. Sin embargo, muchos transportadores se expresan diferencialmente en los distintos tejidos. Por ejemplo, el factor ZnT8 se expresa únicamente en las células β secretoras de insulina del páncreas (Chimienti *et al.*, 2004), mientras que el factor ZnT3 se expresa más en las células del hipocampo y de la corteza cerebral (Palmiter *et al.*, 1996). Además, aunque la mayoría de los genes presentan una regulación de la expresión dependiente de la cantidad de zinc, también existen otros como Zip3 que muestran una expresión independiente del

zinc (Dufner-Beattie *et al.*, 2003). Por tanto, se piensa que deben existir otros factores de transcripción y/o mecanismos de regulación postranscripcionales que activen o modulen la expresión de estos genes. En definitiva, queda mucho por estudiar y descubrir sobre la regulación de la homeostasis de zinc en la especie humana.

6.2. Homeostasis de zinc en *Saccharomyces cerevisiae*

La homeostasis del zinc ha sido ampliamente estudiada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (revisado en Eide, 2003 y en Eide, 2009). En esta levadura se han encontrado proteínas pertenecientes a todas las clases que forman los sistemas de homeostasis de zinc tales como transportadores ZIP (Zrt1, Zrt2, Zrt3 y Ke4), transportadores CDF (Zrc1, Cot1, Msc2 y Zrg17), una metalotioneína (Csr5) y un factor de transcripción regulador (Zap1).

La proteína **Zap1** (Fig. 3I) está formada por 880 aminoácidos (93 kDa) y siempre se halla confinada en el núcleo. Tiene 7 *zinc fingers* (ZnF1-ZnF7), formando los cinco más próximos al extremo carboxilo (ZnF3-ZnF7) el dominio de unión a ADN. Además, Zap1 tiene hacia el extremo amino de su secuencia dos dominios de activación ácidos, AD1 (formado por una región rica en histidinas y cisteínas) (Herbig *et al.*, 2005) y AD2 (formado por los *zinc fingers* ZnF1 y ZnF2 que configuran un *zinc finger pair domain*) (Bird *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2006). Estos dominios son capaces de unir zinc, gracias a lo cual, Zap1 responde específicamente a la concentración de zinc intracelular, de manera que se activa cuando la concentración de zinc es baja y se inactiva si ésta aumenta. Cuando Zap1 está activo es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN, presentes en los promotores de sus genes diana, denominadas elementos de respuesta a zinc o **ZREs** (**Zinc Response Element**). La secuencia consenso de estos elementos es 5'-ACCYNAAGG-3' (Zhao *et al.*, 1998). Zap1 actúa generalmente como activador transcripcional, por tanto activa la expresión de genes relacionados con la homeostasis del zinc cuando la concentración de este metal es baja.

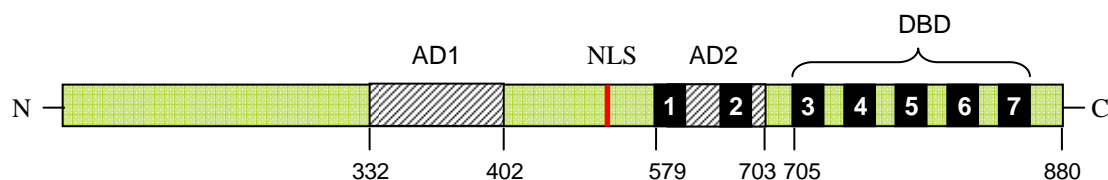


Fig. 3I: Representación esquemática de la proteína Zap1. En negro se marcan los ZnFs. El dominio de unión a ADN, está señalado como DBD. Los rectángulos rayados marcan los dominios de activación ácidos (AD1 y AD2). La secuencia de localización nuclear (NLS) está indicada mediante la línea roja.

Cuando la **disponibilidad de zinc en el medio es baja** (Fig. 4Ia), Zap1 se activa e induce la expresión de su propio gen codificante *ZAP1* y de los genes *ZRT1* y *ZRT2* que codifican los transportadores Zrt1 (Zhao and Eide, 1996a) y Zrt2 (Zhao and Eide, 1996b), encargados de captar y transportar zinc desde el medio al citoplasma. Zap1 también activa la expresión del gen *FET4*, que codifica un transportador de baja afinidad de Fe^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} (Waters and Eide, 2002). Si la disponibilidad de zinc es muy baja se produce un gran incremento de la concentración intranuclear de Zap1 activo, de forma que es capaz de unirse a los sitios ZRE del promotor de *ZRT1* e induce su expresión. A la vez, Zap1 se une al sitio ZRE presente entre la caja TATA y el sitio +1 de inicio de la transcripción del gen *ZRT2*, el cual presenta una afinidad 10 veces menor que los otros sitios ZREs presentes en el promotor, bloqueando la transcripción del gen (Bird *et al.*, 2004). Además, Zap1 también induce la expresión de los genes *ZRT3* y *ZRC1*. El gen *ZRT3* codifica un transportador ZIP (Zrt3) de membrana vacuolar que se encarga de movilizar las reservas de zinc presentes en la vacuola (MacDiarmid *et al.*, 2000). El gen *ZRC1* codifica un transportador CDF encargado de transportar zinc al interior de la vacuola. La expresión de *ZRC1* en esta condición se atribuye a un mecanismo de defensa para prevenir un posible *zinc-shock* (MacDiarmid *et al.*, 2003). Este proceso consiste en un aumento brusco de la disponibilidad de zinc en el medio cuando el transportador de alta afinidad Zrt1 se encuentra en alto número de copias en la membrana plasmática. Debido a su gran capacidad de transporte, antes de que la célula elimine la proteína de la membrana mediante su ubiquitinación y posterior endocitosis (Gitan *et al.*, 2003), ésta será capaz de transportar enormes cantidades de zinc al interior celular, el cual puede resultar tóxico para la levadura. Activando la expresión del transportador Zrc1, *S. cerevisiae* se asegura de tener preparado un mecanismo de detoxificación de zinc, el acúmulo en la vacuola, por si se produce un *zinc-shock*.

En **condiciones de alta disponibilidad de zinc** (Fig. 4Ib), el transportador Zap1 permanece inactivo debido a la unión de Zn^{2+} a sus dominios de activación ácidos y no produce la transcripción de estos genes. Una expresión basal de *ZRT2* produce el nivel suficiente del transportador de baja afinidad Zrt2 en la membrana plasmática que asegura el aporte de zinc necesario para el crecimiento normal de la célula. En estas condiciones, los transportadores CDF de membrana vacuolar Zrc1 y Cot1 se encargan de transportar el posible exceso de zinc al interior de la vacuola creando un reservorio de zinc. (MacDiarmid *et al.*, 2000). Este reservorio podrá ser movilizado por el transportador Zrt3 bajo condiciones de deficiencia de zinc para ser utilizado por la célula. De hecho, la vacuola puede llegar a acumular zinc en cantidad tan elevada que permitiría mantener varias generaciones de células en ausencia de aporte externo del metal (Simm *et al.*, 2007). Además, existe otro compartimento vesicular capaz de acumular zinc que no se corresponde con la vacuola, el retículo endoplasmático ni el Golgi. Este tipo de vesículas se denominan zincosomas y parecen estar también implicados en la detoxificación y acúmulo de zinc, aunque no se conocen las proteínas implicadas en el proceso (Devirgiliis

et al., 2004; Eide, 2006). Por último, la metalotioneína Csr5 es capaz de secuestrar zinc evitando que pueda resultar tóxico para la célula (Pagani *et al.*, 2007).

El hecho de que un triple mutante *zrt1Δzrt2Δfet4Δ* sea viable y capaz de crecer en medios ricos en zinc demuestra que deben existir otras vías de introducción de zinc en la célula. Se ha descrito que el transportador de alta afinidad de fosfato Pho84 es capaz de transportar zinc al interior celular (Jensen *et al.*, 2003). Sin embargo, este mecanismo solamente es relevante para la adquisición de zinc en ambientes limitantes en fosfato, puesto que la expresión del gen *PHO84* únicamente ocurre esas condiciones. Por tanto, es posible que exista algún otro mecanismo aún no identificado que ayude a las células a captar zinc en otras condiciones de deficiencia de este metal.

Además de los transportadores hasta ahora mencionados existen dos proteínas de la familia CDF (Msc2 y Zrg17) y una de la familia ZIP (Ke4) encargadas de transportar zinc al interior del retículo endoplásmico (RE), donde el zinc es necesario para la correcta síntesis y plegamiento de proteínas, y además comunica con otros compartimentos de la ruta de secreción (Ellis *et al.*, 2005; Kumanovics *et al.*, 2006). La permeasa Ke4 parece ser un transportador bidireccional, de forma que introduce o retira zinc del RE según las necesidades del momento. En cuanto a la regulación de su expresión, *ZRG17* está controlado por Zap1, mientras que *MSC2* y *KE4* no lo están (Ellis *et al.*, 2005; Kumanovics *et al.*, 2006).

Saccharomyces cerevisiae crece mejor en ambientes ácidos que en entornos neutros o básicos (Matthews and Webb, 1991). La adaptación de la levadura al pH alcalino implica un cambio en su patrón de expresión génica, producido por la acción de diferentes rutas de transducción, entre las que se incluyen la ruta de la calcineurina (Cna) (Serrano *et al.*, 2002) y la ruta de Rim101 (Lamb *et al.*, 2001). En medio alcalino la biodisponibilidad de metales es menor ya que se favorece la formación de complejos metálicos insolubles (Martínez and Motto, 2000). Por consiguiente, entre los genes que aumentan su expresión en ambientes alcalinos se encuentran genes relacionados con la adquisición de hierro y cobre (Serrano *et al.*, 2004). Sin embargo, los genes directamente implicados en la adquisición de zinc del entorno, *ZRT1* y *ZRT2*, no varían su expresión en ambientes alcalinos, como puede deducirse de los estudios de expresión a gran escala realizados en la levadura (Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002; Lamb and Mitchell, 2003). Por esta razón, es muy posible que la capacidad de *S. cerevisiae* de adquirir zinc de un entorno alcalino sea insuficiente para alcanzar el crecimiento óptimo y, por tanto, que la deficiencia de zinc sea una de las múltiples razones por las que la levadura crece peor en ambientes alcalinos.

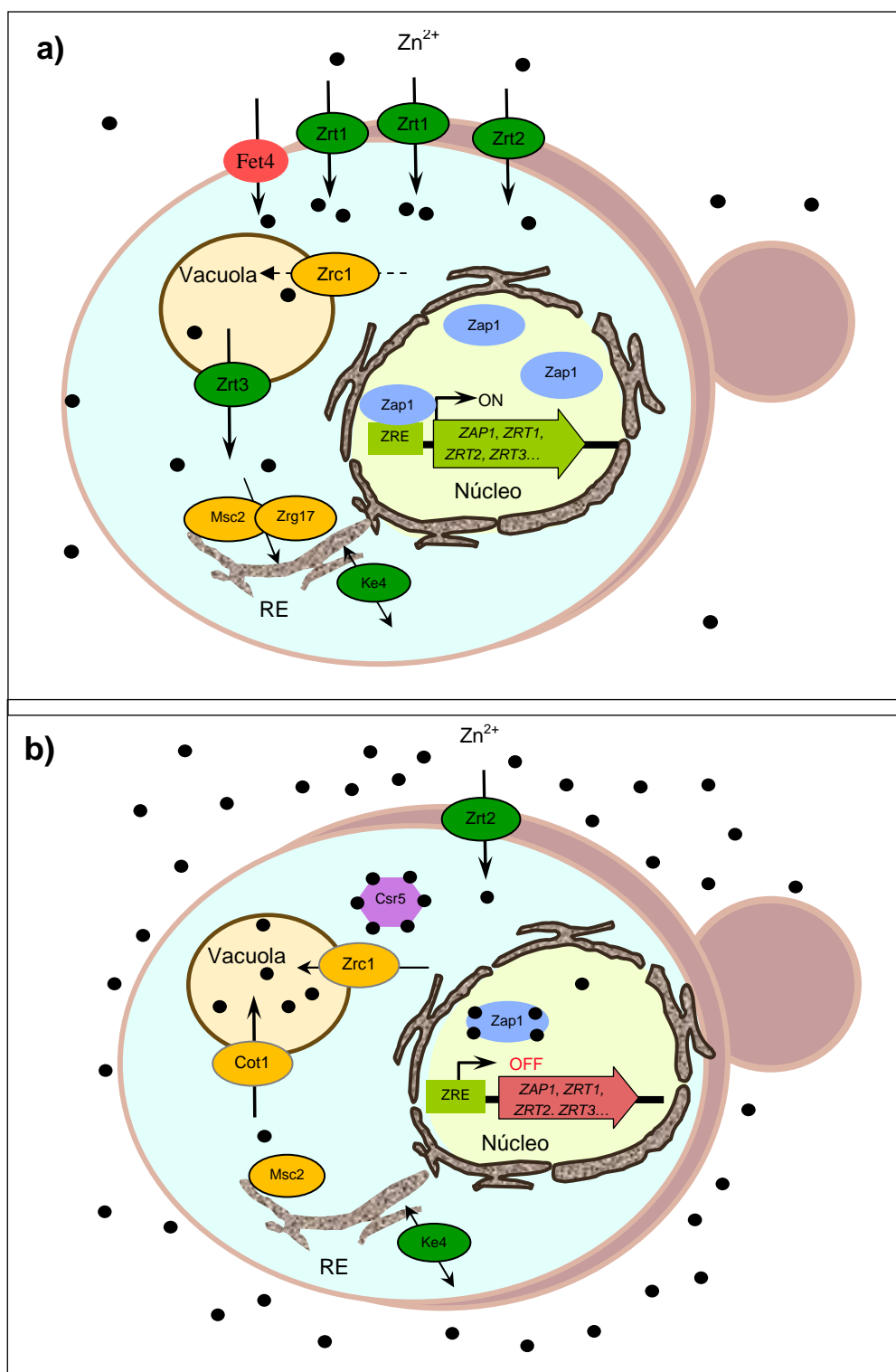


Fig. 4I: Proteínas implicadas en la homeostasis del zinc en *S. cerevisiae*. Las proteínas CDF se representan en color amarillo y las ZIP en color verde. **(a)** Levadura creciendo en un medio limitante en zinc. **(b)** Levadura creciendo en un medio repleto de zinc. Explicación en el texto. Los puntos negros representan los iones Zn^{2+} .

7. Regulación de la expresión génica por pH en *Aspergillus*

Una de las características más importantes de *A. fumigatus* que posibilita que crezca en los tejidos vivos es su gran capacidad para adaptar la expresión génica al pH ambiental. De hecho, se ha demostrado que la capacidad de *Aspergillus* para crecer al pH fisiológico es fundamental para la virulencia del hongo (Bignell *et al.*, 2005). Sin embargo, la capacidad de crecer al pH fisiológico implica la regulación de la expresión de muchos genes, incluyendo la de los implicados en la obtención de metales a partir de tejidos vivos.

El mecanismo de regulación de la expresión génica por el pH ambiental ha sido ampliamente estudiado en la especie *Aspergillus nidulans* (Peñalva and Arst, 2004; Peñalva *et al.*, 2008). En esta especie, la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional depende principalmente de la proteína PacC (Tilburn *et al.*, 1995). La proteína PacC de *A. nidulans* consta de 678 aminoácidos (Fig. 5I). En la zona N-terminal contiene tres ZnFs del tipo C₂H₂ con los que se une a la secuencia consenso 5'-GCCARG-3' presente de los promotores de los genes que regula (Espeso *et al.*, 1997). En el ZnF3 presenta una secuencia de localización nuclear (NLS). Además, en la proteína existen tres regiones, denominadas A, B y C, que le permiten establecer interacciones intramoleculares que mantienen la proteína en una conformación cerrada (PacC⁷²) (Espeso *et al.*, 2000; Mingot *et al.*, 2001).

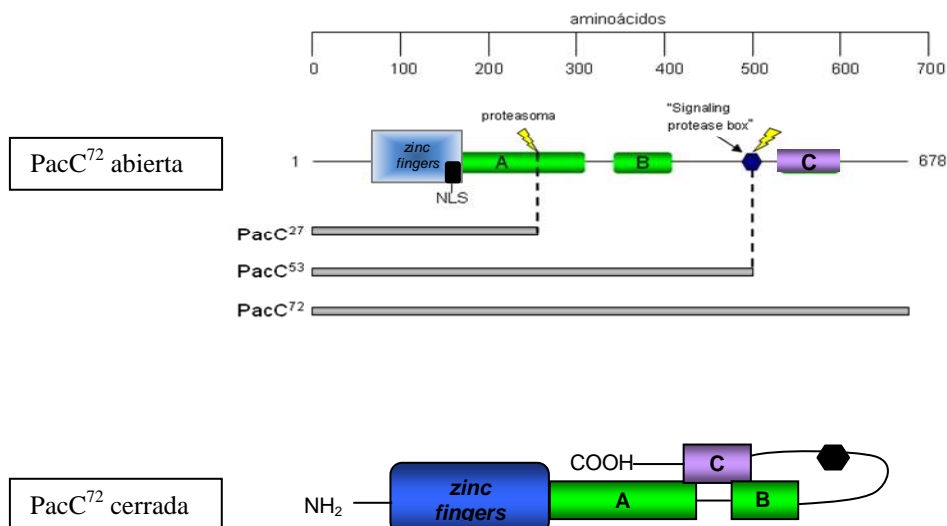


Fig. 5I. Representación esquemática de la estructura de la proteína PacC de *A. nidulans*.

PacC tiene una cierta expresión basal constitutiva. Cuando *Aspergillus* crece en un medio **ácido**, PacC se encuentra libre en el citoplasma en la conformación cerrada e inactiva (PacC⁷²) (Espeso *et al.*, 2000). Por el contrario, cuando el pH del medio es **alcalino** (Fig. 6I) se activa una cascada de señalización en la que participan las proteínas Pal, implicadas en la recepción y transducción de la señal de pH (Negrete-Urtasun *et al.*, 1999). Esta cascada comienza cuando la proteína de membrana PalH, asistida por PalI, capta la señal y media en la fosforilación y ubiquitinación de PalF. Posteriormente, de alguna manera PalF ubiquitinado transfiere la señal a la maquinaria de procesamiento de PacC (PalC-PalA), presente en las membranas endosomales, vinculada al sistema de transporte de proteínas al lisosoma (complejo ESCRT III). Finalmente, se recluta a la proteasa PalB (Vincent *et al.*, 2003; Herranz *et al.*, 2005) que digiere a PacC, produciendo un corte en un sitio situado entre las regiones B y C denominado SPB (*signaling protease box*). De esta manera se elimina la región C-terminal y se genera una forma intermediaria (PacC⁵³) que es rápidamente reconocida y procesada por el proteasoma (Hervás-Aguilar *et al.*, 2007) y convertida en la forma madura activa (PacC²⁷) (Orejas *et al.*, 1995). La forma PacC²⁷ migra al núcleo (Mingot *et al.*, 2001) donde se une a la secuencia consenso 5'-GCCARG-3' (PR) que se encuentra en los promotores de los genes que regula activando la transcripción de genes que se expresan a pH alcalino e inhibiendo la transcripción de genes que se expresan a pH ácido.

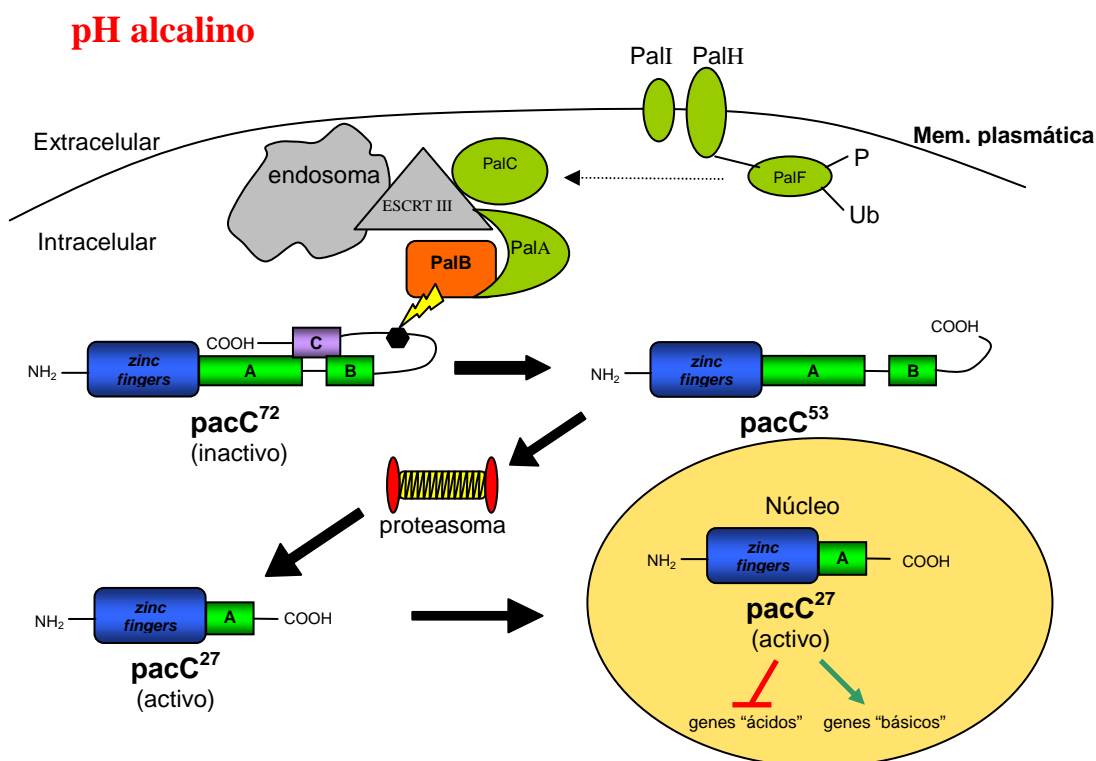


Fig. 6I. Modelo aceptado de activación de PacC y regulación de la expresión génica que realiza a pH alcalino.

8. Homeostasis del zinc en *Aspergillus fumigatus*

En *A. fumigatus* se han identificado hasta la fecha 9 genes que codifican transportadores de la familia ZIP (*zrfA-zrfH*) (Calera and Hass, 2009), 5 genes que codifican permeasas de la familia CDF (*zrcA*, *cotA*, *zrgA* y *mscA*) (Calera and Hass, 2009) y un factor de transcripción regulador (ZafA) (Moreno *et al.*, 2007b). Hasta el momento, ninguna metalotioneína ha sido hallada (Fig. 7I).

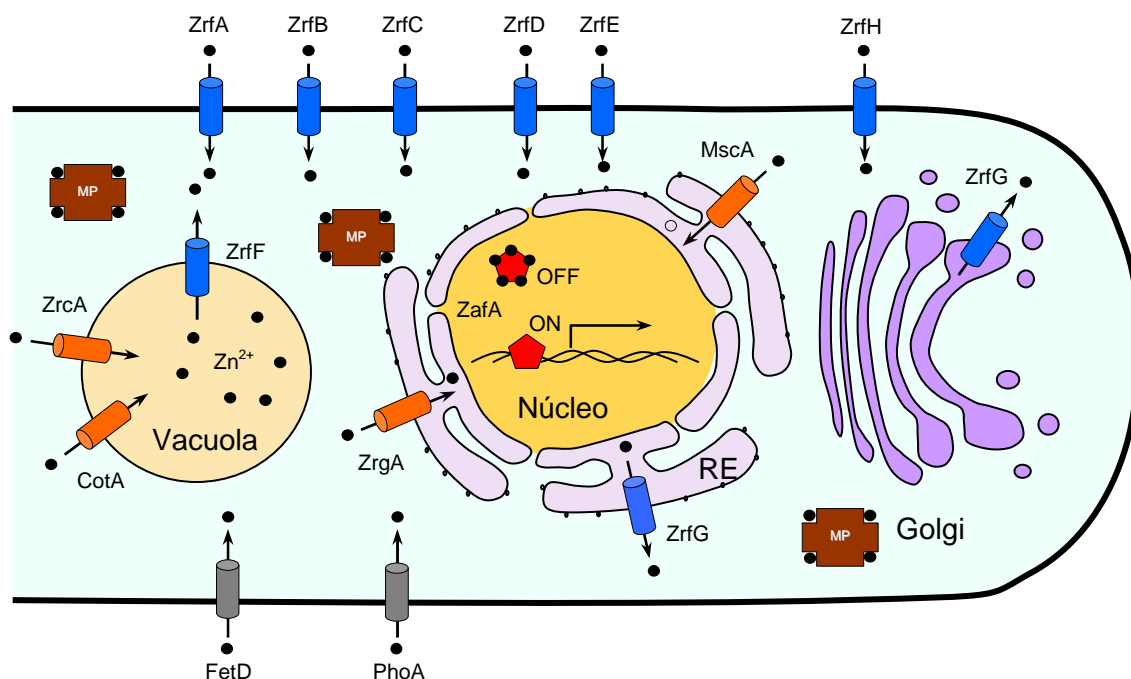


Fig. 7I: Representación esquemática de los componentes del sistema de la homeostasis del zinc en *A. fumigatus*. Cada proteína se representa en la localización subcelular más probable en base a lo que actualmente se conoce sobre su ortóloga en *S. cerevisiae*. Los transportadores de zinc de la familia ZIP se representan como cilindros azules. Las proteínas de la familia CDF se muestran como cilindros naranjas. Otras proteínas presumiblemente involucradas en la homeostasis del zinc se dibujan como cilindros grises. El activador transcripcional de respuesta a zinc (ZafA) se representa como un pentágono rojo tanto en su estado activo como inactivo (saturado con iones Zn^{2+}). Se representan las metaloproteínas (MP), en color marrón, ya que a pesar de no haber sido halladas es presumible su existencia. Los iones Zn^{2+} se muestran como pequeños círculos negros.

El estudio de la homeostasis del zinc en *A. fumigatus* comenzó con la identificación de los genes *zrfA* y *zrfB*, ortólogos de los genes *ZRT1* y *ZRT2* de *S. cerevisiae*, y el estudio de los transportadores ZIP que codifican. El análisis de la función de estas proteínas (ZrfA y ZrfB) demostró que conforman un sistema de adquisición de zinc imprescindible para el crecimiento del hongo en medio ácido limitante en zinc, pero dispensable para el

crecimiento en medio alcalino limitante en zinc (Fig. 8Ia) (Vicentefranqueira *et al.*, 2005). En concordancia, la transcripción de los genes *zrfA* y *zrfB* ocurre únicamente en condiciones limitantes de zinc y preferentemente a pH ácido (Fig. 8Ib) (Vicentefranqueira *et al.*, 2005).

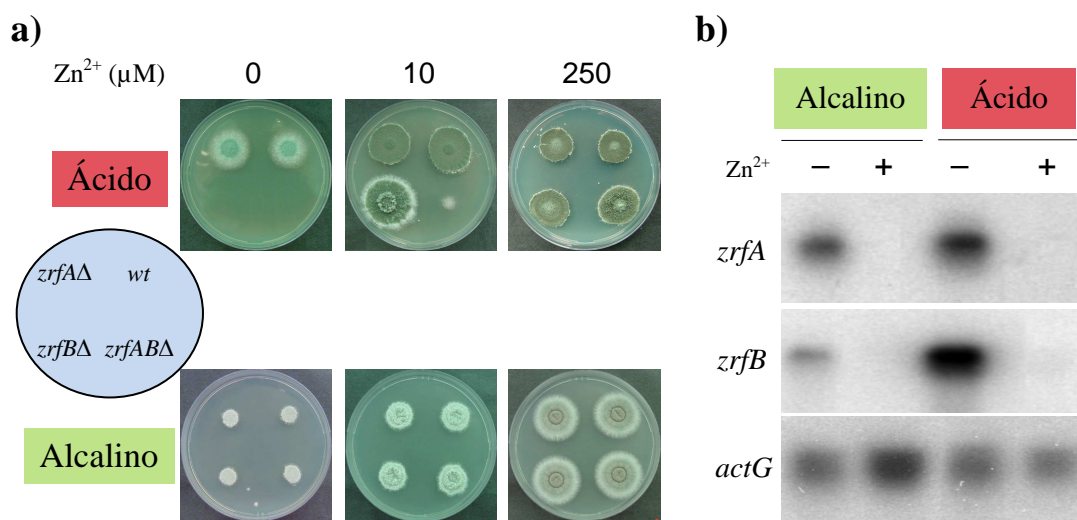


Fig. 8I: (a) Crecimiento de las cepas silvestre (*wt*), mutantes simples *zrfAΔ* y *zrfBΔ* y mutante doble *zrfAΔzrfBΔ* en medio ácido (SDA) y alcalino (SDN) sin y con cantidades crecientes de zinc. Este ensayo fenotípico demostró que los transportadores ZrfA y ZrfB son necesarios para el crecimiento de *A. fumigatus* en medio ácido limitante en zinc, y dispensables para el crecimiento a pH alcalino. (b) Expresión de los genes *zrfA* y *zrfB* en medios alcalinos y ácidos con (100 μM) y sin suplemento de zinc. La expresión del gen de la actina (*actG*) se utiliza como control de carga. Este análisis demostró que ambos genes se expresan exclusivamente en condiciones limitantes de zinc y preferentemente a pH ácido.

El patrón de expresión génica de *zrfA* y *zrfB* sugería que *A. fumigatus*, como otros organismos ya descritos, debía tener un factor regulador que controle la expresión de los genes relacionados con la homeostasis del zinc en función de la disponibilidad medioambiental de este metal. Por similitud al factor Zap1 de *S. cerevisiae* se identificó la proteína ZafA y se demostró que es el regulador transcripcional encargado de activar la expresión de estos genes en condiciones limitantes de zinc (Moreno *et al.*, 2007b). De igual manera, la expresión de *zafA* ocurre en medios limitantes en zinc y es independiente del pH del medio (Fig. 9Ia). Consecuentemente, una cepa mutante deficiente en el gen (*zafAΔ*) es incapaz de crecer en cualquier condición limitante de zinc (Fig. 9Ib) (Moreno *et al.*, 2007b). Es muy probable que ZafA realice la regulación de la expresión génica mediante su unión directa a una secuencia de 14 pb (5'-HYYYCAAGGTNYBY-3') presente en el promotor del propio gen *zafA* y que está conservada en las regiones

promotoras de otros genes implicados en la homeostasis del zinc, como *zrfA* y *zrfB* (datos no publicados). Por consiguiente, estas secuencias consenso se denominaron elementos de respuesta a zinc o secuencias ZR (**Z**inc **R**esponse). Además, mediante modelos murinos de aspergilosis invasiva se demostró que la cepa *zafAΔ* es avirulenta (Moreno *et al.*, 2007b). Esto puede achacarse a la incapacidad de este mutante de crecer en el ambiente alcalino y extremadamente limitante en zinc que constituye el pulmón humano, al no poder expresar las proteínas necesarias para la captación de zinc.

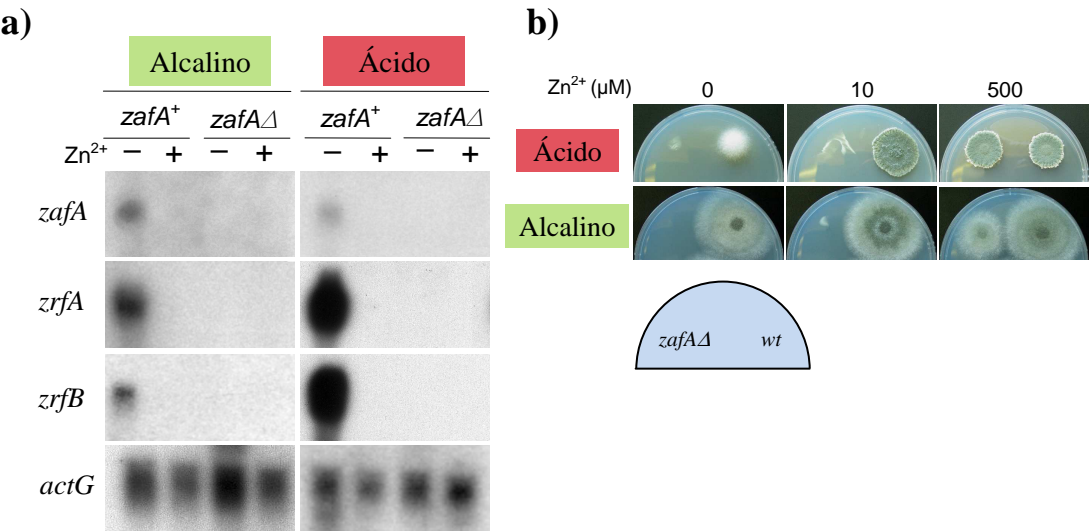


Fig. 9I: (a) Análisis de la expresión de los genes *zafA*, *zrfA* y *zrfB* en las cepas silvestre y mutante *zafAΔ* en medios ácidos y alcalinos con (100 μM) y sin suplemento de zinc. El gen de la actina (*actG*) se utiliza como control de carga. Este análisis demostró que el factor ZafA es el encargado de activar la expresión de los genes relacionados con la homeostasis del zinc, y que su expresión es independiente del pH del medio. (b) Crecimiento de las cepas silvestre y *zafAΔ* en medio ácido (SDA) y alcalino (SDN) sin y con suplementos crecientes de zinc. Este ensayo fenotípico demostró que el factor de transcripción ZafA es necesario para la adquisición de zinc en condiciones limitantes, independientemente del pH del medio.

Sin embargo, las proteínas ZrfA y ZrfB no son relevantes para obtener zinc a partir de medios limitantes en este catión, por lo que se puede deducir que *A. fumigatus* debe poseer al menos un gen que codifique un transportador ZIP de membrana plasmática encargado de la adquisición de zinc a partir de medios alcalinos limitantes en este catión, estando la expresión de ese gen regulada por ZafA. La búsqueda en el genoma de *A. fumigatus* (disponible on-line en <http://www.tigr.org/tdb/e2kl1/afu1/>) reveló la existencia de 8 posibles genes codificantes de permeasas de zinc: *zrfA-zrfH* (Calera and Hass, 2009). Por tanto, se estudió el patrón de expresión de todos ellos (Fig. 10I).

o

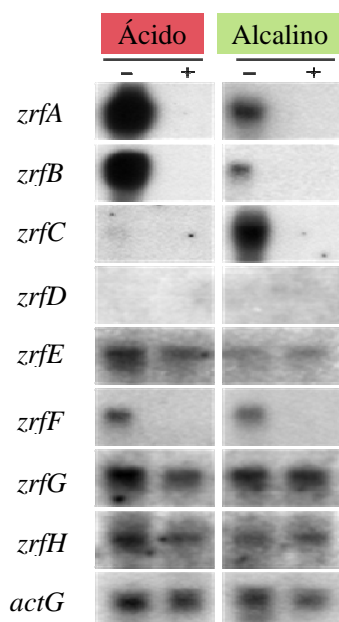


Fig. 10I: Análisis por Northern-blot de la expresión de los genes que codifican posibles permeasas de zinc de la familia ZIP en *A. fumigatus* (*zrfA-zrfH*). El gen de la actina (*actG*) se utiliza como control de carga.

Como se observa en la figura, los genes *zrfE*, *zrfG* y *zrfH* se expresaban en todas las condiciones estudiadas, de lo que se deduce que su expresión no está regulada por disponibilidad de zinc ni por pH, mientras que el gen *zrfD* no se expresaba en ninguna de las condiciones testadas. Por otra parte, el gen *zrfF* sólo se expresaba en condiciones limitantes de zinc, pero independientemente del pH. Los genes *zrfA* y *zrfB* mostraban el mismo patrón de expresión que ya había sido observado, es decir, se expresaban exclusivamente en condiciones limitantes de zinc y preferentemente a pH ácido. Por tanto, el único gen que se expresaba específicamente a pH alcalino en condiciones limitantes de zinc era *zrfC*, de manera que es muy posible que éste sea el gen codificante de la permeasa encargada de adquirir zinc en medio alcalino. Además, el gen *zrfC* presenta una expresión divergente con el gen *aspf2*, ambos bajo el control del mismo promotor. Este gen codifica el antígeno inmunodominante Aspf2, cuya expresión sólo ocurre en medios limitantes en zinc, independientemente de la temperatura y/o fuente de carbono o nitrógeno (Calera *et al.*, 1997; Segurado *et al.*, 1999). La alta reactividad detectada en los sueros de pacientes frente a Aspf2 es una prueba indirecta de que este antígeno se ha de producir durante el crecimiento del hongo en los tejidos del hospedador (Fig. 11I) (Calera *et al.*, 1997). Por tanto, es más que probable que el gen *zrfC* también se esté expresando cuando *A. fumigatus* crece en un hospedador susceptible y que sea el encargado de adquirir zinc en este ambiente extremadamente limitante.

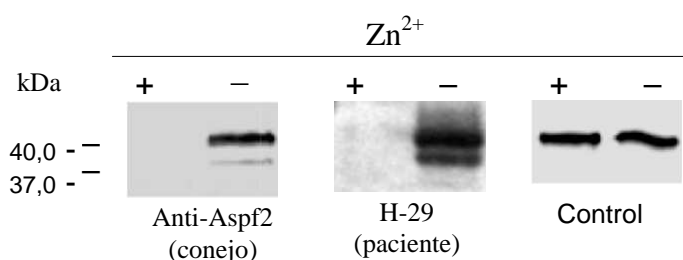


Fig. 11I: Análisis por Western-blot de la síntesis de Aspf2 en medios alcalinos limitantes en zinc.

9. Objetivos del trabajo

El objetivo de este estudio se centra en **investigar el sistema de adquisición de zinc a pH alcalino de *Aspergillus fumigatus* y su relevancia en el crecimiento y virulencia de este hongo patógeno**. Para ello los objetivos concretos que se plantearon fueron los siguientes:

1. Determinar si la regulación por pH de la expresión de los genes relacionados con la homeostasis del zinc depende del factor de transcripción PacC.
2. Analizar la expresión de los genes *zrfC* y *aspf2* a nivel transcripcional y desentrañar la regulación de la misma.
3. Establecer la función de los genes *zrfC* y *aspf2* en la adquisición de zinc en *A. fumigatus* en medios alcalinos limitantes en zinc.
4. Determinar la importancia del gen *zrfC* en la virulencia de *A. fumigatus* en un modelo murino de aspergilosis pulmonar invasiva.

A blue wavy line that starts with a small peak, dips, rises to a larger peak, and then dips again before ending.

RESULTADOS

En esta sección de la memoria se expondrá el trabajo experimental y los resultados obtenidos durante la realización de la Tesis Doctoral. El apartado se ha dividido en tres capítulos diferentes, aunque todos ellos están englobados en el objetivo global del trabajo, que es **el estudio del sistema de adquisición de zinc a pH alcalino de *Aspergillus fumigatus* y su relevancia en el crecimiento y virulencia de este hongo patógeno.**

Los dos primeros capítulos incluyen el trabajo ya publicado en revistas científicas. El primero de ellos se centra en el estudio de la regulación por pH de la transcripción de los genes *zrfA* y *zrfB*, mientras que el segundo capítulo se centra en estudio de la función de los genes *zrfC* y *aspf2* en el crecimiento de *A. fumigatus* en medios alcalinos limitantes en zinc, así como en la regulación de su expresión a nivel transcripcional. Al comienzo de cada capítulo se presenta un resumen breve y conciso en el que se explican los antecedentes, objetivos y principales resultados del trabajo. En ambos casos también se ha incluido un apartado con resultados complementarios no publicados.

El tercer capítulo contiene el trabajo (no publicado) realizado para estudiar la relevancia del sistema de adquisición de zinc en la virulencia de *A. fumigatus* utilizando un modelo murino de aspergilosis pulmonar invasiva.

Los capítulos presentados en la memoria son:

- **Capítulo I:** La represión del sistema ácido de adquisición de zinc ZrfA/ZrfB de *Aspergillus fumigatus* está mediada por el factor PacC en condiciones alcalinas limitantes en zinc.

(Artículo 1)

Amich, J., Leal, F. and Calera, J.A. (2009) Repression of the acid ZrfA/ZrfB zinc-uptake system of *Aspergillus fumigatus* mediated by PacC under neutral, zinc-limiting conditions. *Int Microbiol.* **12**(1): 39-47.

- **Capítulo II:** La supervivencia de *Aspergillus fumigatus* en ambientes alcalinos extremadamente limitantes en zinc depende de la inducción de un sistema de homeostasis de zinc codificado por los genes *zrfC-aspf2*.

(Artículo 2)

Amich, J., Vicentefranqueira, R., Leal, F. and Calera, J.A. (2010) *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC-aspf2* genes. *Eukaryot Cell* **9**(3):424-437

- **Capítulo III:** Importancia de la capacidad de adquisición de zinc a partir de medios alcalinos extremadamente limitantes en zinc en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*.

CAPÍTULO I:

La represión del sistema ácido de adquisición de zinc ZrfA/ZrfB de *Aspergillus fumigatus* está mediada por el factor PacC en condiciones alcalinas limitantes en zinc

1. Antecedentes

Los genes *zrfA* y *zrfB* de *A. fumigatus* codifican las proteínas ZrfA y ZrfB, respectivamente, que son transportadores de zinc de la familia ZIP. El análisis fenotípico de las cepas mutantes *zrfA*Δ, *zrfB*Δ y *zrfA*Δ*zrfB*Δ de *A. fumigatus*, en combinación con ensayos de complementación en *S. cerevisiae*, nos permitió demostrar que estos transportadores componen un sistema de adquisición de zinc que principalmente opera en medios ácidos, cuando la disponibilidad de este metal es limitada (Vicentefranqueira *et al.*, 2005). El activador transcripcional dependiente de zinc ZafA induce la expresión de *zrfA* y *zrfB* en condiciones limitantes en zinc (Moreno *et al.*, 2007b). Sin embargo, analizando la capacidad de crecimiento de las cepas mutantes y el patrón de expresión de estos genes, se descubrió que su expresión no se encontraba únicamente regulada por la disponibilidad de zinc del medio, si no que su transcripción se reducía significativamente cuando el hongo crecía en ambientes alcalinos (Fig. 9I). Un examen detallado de la regiones promotoras de ambos genes reveló la presencia en cada una de ellas de un sitio consenso de unión del factor de transcripción PacC (5'-GCCARG-3'), principal encargado de la regulación de la expresión génica por pH en *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995). Por tanto, era muy probable que la represión parcial de la expresión de *zrfA* y *zrfB* a pH alcalino dependiera de la proteína PacC de *A. fumigatus*, ortóloga del factor PacC de *A. nidulans*.

2. Objetivo principal

Demostrar que la expresión de *zrfA* y *zrfB* a pH alcalino es parcialmente reprimida por PacC.

3. Objetivos experimentales específicos

1. Identificación del gen *pacC* de *A. fumigatus*.
2. Construcción de una cepa mutante de *A. fumigatus* que exprese una versión mutada del gen *pacC* que mimetice el crecimiento de *A. fumigatus* a pH alcalino (mutante “básico”) y de otra que mimetice el crecimiento a pH ácido (mutante “ácido”), independientemente del pH del medio.

3. Análisis de la expresión de *zrfA* y *zrfB* en los mutantes “ácido” y “básico”.

4. Resultados

El gen *pacC* de *A. fumigatus* (*Af-pacC*) se identificó mediante la búsqueda en la base de datos GenBank utilizando de referencia el gen *pacC* de *A. nidulans*. La proteína codificada, Af-PacC presenta un 66,5% de identidad y un 71,6% de similitud con su ortóloga de *A. nidulans*.

Los mutantes “básico” (AF58) y “ácido” (AF60) se construyeron de tal manera que resultaran análogos a los mutantes *pacC^c14* y *pacC^{+/−}20205* de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999). Se analizó la capacidad de crecimiento de las cepas generadas para comprobar que mimetizaran el crecimiento a pH alcalino y ácido, respectivamente, independientemente del pH ambiental. Posteriormente, se analizó la expresión del propio gen *pacC* en la cepa silvestre y en los mutantes “básico” y “ácido”. Así, se comprobó que la expresión de *pacC* en la cepa silvestre era ligeramente mayor a pH alcalino que a pH ácido, al igual que ocurre en *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995), y que no estaba influenciada por la disponibilidad de zinc. Además, en concordancia con las mutaciones realizadas, la cepa “básica” expresaba un *pacC* de menor tamaño que el silvestre y siempre en cantidad similar a la cepa silvestre creciendo a pH alcalino, mientras que la cepa “ácida” producía un transcrito de *pacC* de tamaño intermedio entre el silvestre y el “básico” y siempre en cantidad semejante a la cepa silvestre creciendo a pH ácido.

Finalmente, se analizó la expresión de los genes *zrfA* y *zrfB* en los mutantes “básico” y “ácido”. Se comprobó que en el mutante “básico” ambos genes se expresaban igual que en el silvestre creciendo a pH alcalino, independientemente del pH del medio, mientras que en el mutante “ácido” ambos genes se expresaban igual que en un silvestre creciendo a pH ácido, independientemente del pH del medio. Por tanto, **la represión parcial de la expresión de *zrfA* y *zrfB* a pH alcalino es realizada por el factor PacC.**

5. Información adicional

Además del estudio del crecimiento en medios sólidos, también se realizó el estudio del crecimiento de los mutantes “básico” y “ácido” en medios líquidos.

Los medios líquidos permiten un fácil control de los cambios que puedan ocurrir en su composición como resultado del crecimiento microbiano, por ejemplo, variaciones de pH. Por tanto, el estudio del crecimiento de las cepas en medios líquidos permitió, además de completar la caracterización fenotípica de los mutantes “básico” y “ácido”, determinar las condiciones idóneas para la obtención de ARN que permitieran realizar los estudios de expresión génica de los genes *zrfA* y *zrfB*.

En primer lugar se cultivaron las cepas en medio AMMH sin tamponar (Fig. 1Ra) y tamponado a pH alcalino (Fig. 1Rb), con y sin suplemento de zinc, y se elaboraron las correspondientes curvas de crecimiento y de evolución de pH del medio. Este medio se seleccionó en primera instancia porque tradicionalmente ha sido el utilizado para realizar los estudios en relación con pH en *Aspergillus*.

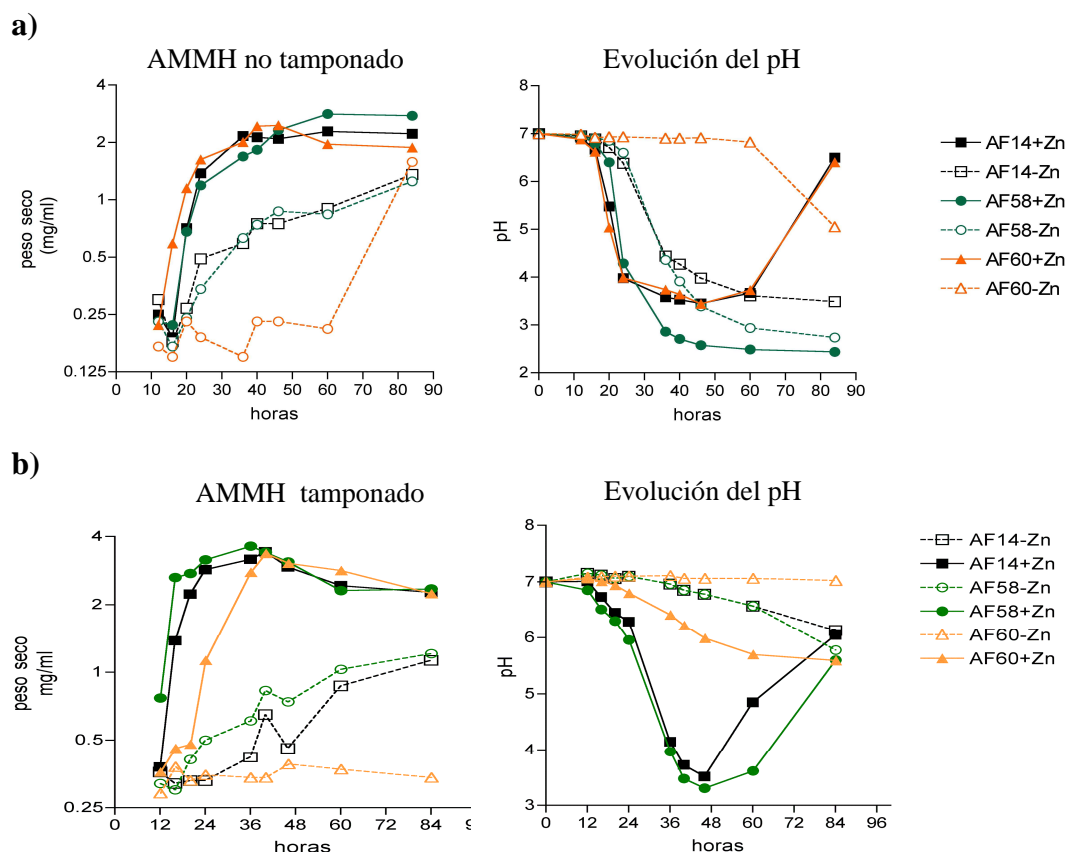


Fig.1R. Crecimiento de la cepa silvestre (AF14) y de los mutantes “básico” (AF58) y “ácido” (AF60) en medios AMMH no tamponado (a) y tamponado (pH 7,5) (b) suplementados con 100 μ M (+Zn) o sin suplemento de zinc (-Zn), y evolución del pH de los medios durante el cultivo. En todos los casos se inocularon 5×10^5 esporas/mL de medio y se incubaron a 37° C.

En **condiciones no limitantes de zinc**, todas las cepas alcanzaron pesos secos similares, tanto con pH tamponado como sin tamponar. En medio **AMMH no tamponado limitante en zinc**, las cepas silvestre y “básica” crecían de manera semejante, mientras que el mutante “ácido” presentaba un importante retraso en el crecimiento, aunque finalmente fue capaz de alcanzar el mismo peso seco que la cepa “básica”, debido a que la paulatina acidificación del medio sin tamponar producida como consecuencia del lento crecimiento de la cepa “ácida”, poco a poco generaba las condiciones idóneas para su crecimiento. Por el contrario, en medio **AMMH tamponado limitante en zinc** la cepa “ácida” apenas era capaz de formar micelio, mientras que el mutante “básico” crecía igual que el silvestre y alcanzaron pesos secos similares. Por tanto, este medio no era adecuado para cultivar la cepa “ácida”. Además, tanto en el medio no tamponado como en el tamponado el pH tendía a acidificarse, por lo que a las 24 horas de cultivo, momento en que se recolecta el micelio para obtener ARN, el pH ya era ligeramente ácido (≈ 6). Por tanto, estos medios podrían servir para estudiar la expresión génica a pH ácido, pero no a pH alcalino. Por otra parte, el trabajo realizado en el laboratorio demostró que los medios SDA y SDN eran idóneos para realizar estudios de expresión génica controlando conjuntamente las condiciones de zinc y pH (Moreno *et al.*, 2007a). Por tanto, a pesar de que estos medios no eran los habitualmente utilizados en las investigaciones sobre pH en *Aspergillus*, se decidió comprobar el crecimiento de las cepas en los medios SDA (pH 4,5) (Fig. 2Ra) y SDN (pH 7,5) (Fig. 2Rb) limitantes y no limitantes en zinc.

De nuevo el crecimiento de las cepas se ajustó al patrón esperado. En **condiciones no limitantes en zinc** todas las cepas alcanzaron pesos secos similares, tanto a pH ácido como alcalino. En el medio **SDA ácido limitante en zinc** la cepa “ácida” crecía igual que el silvestre, mientras que la “básica” presentaba una ligera reducción en el peso seco máximo alcanzado. En el medio **SDN alcalino limitante en zinc** la cepa “básica” presentaba el mismo peso seco máximo que el silvestre, mientras que la “ácida” alcanzaba un peso seco máximo inferior. Además, a las 24 horas de cultivo, el pH de los cultivos se ajustaba a los requerimientos para realizar los estudios de expresión génica. Es decir, el medio SDA presentaba pH ácido, y el pH del medio SDN se mantenía sin cambios, tanto en condiciones limitantes como no limitantes en zinc.

Estos resultados confirmaron que las cepas AF58 y AF60 mimetizaban el crecimiento a pH alcalino y ácido, respectivamente, independientemente del pH del medio.

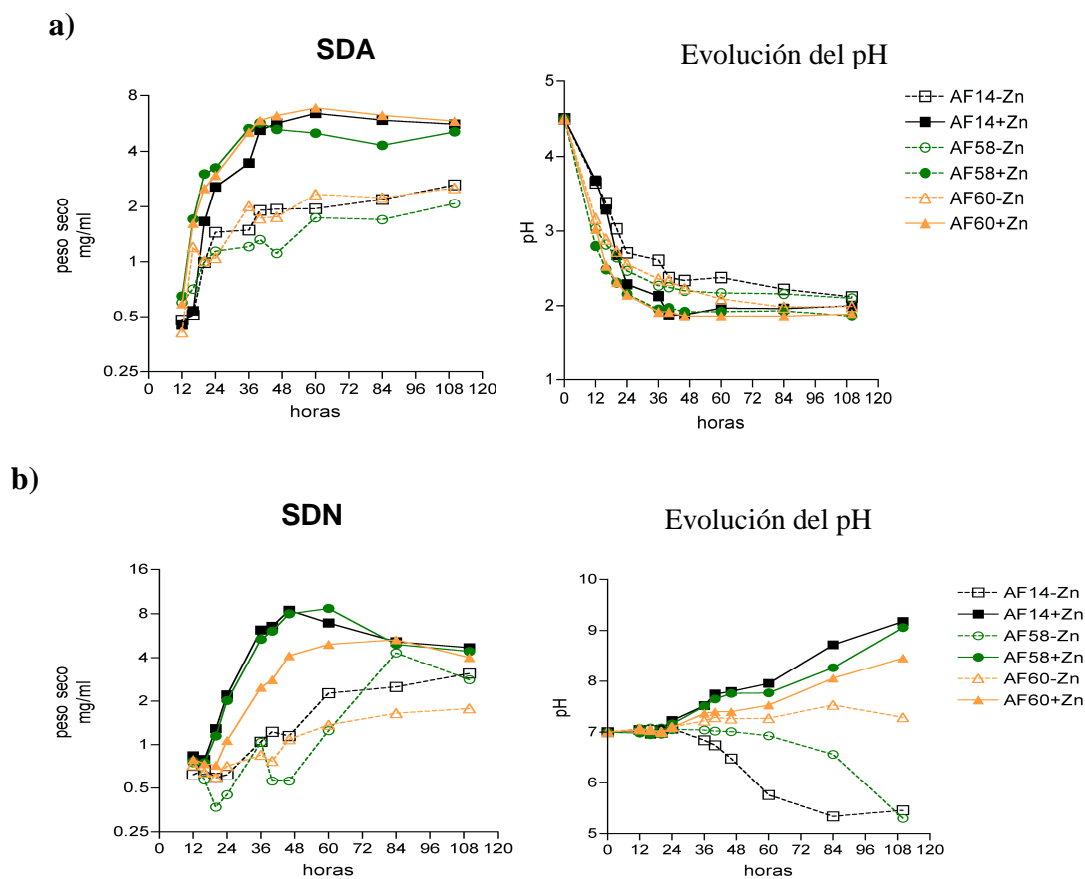


Fig. 2R. Crecimiento de la cepa silvestre (AF14) y de los mutantes “básico” (AF58) y “ácido” (AF60) en medios SDA (**a**) y SDN (**b**), suplementados con 100 μ M (+Zn) o sin suplemento de zinc (–Zn), y evolución del pH de los medios durante el cultivo. En todos los casos se inocularon 5×10^5 esporas/mL de medio y se incubaron a 37° C.

CAPÍTULO II:

La supervivencia de *Aspergillus fumigatus* en ambientes alcalinos extremadamente limitantes en zinc depende de la inducción de un sistema de homeostasis de zinc codificado por los genes *zrfC*-*aspf2*

1. Antecedentes

Como se ha comentado en el apartado de introducción de esta memoria, de los 8 genes identificados en el genoma de *A. fumigatus* que codifican proteínas ZIP (*zrfA*-*zrfH*) (Calera and Hass, 2009), únicamente la expresión de *zrfA*, *zrfB* y *zrfC* está influenciada por el pH y por la concentración ambiental de zinc. Previamente se había demostrado que la expresión de los genes *zrfA* y *zrfB* es máxima en medios ácidos y, además, la delección simultánea de ambos genes no afecta a la capacidad de crecimiento de *A. fumigatus* en medio alcalino limitante en zinc. Por tanto, *zrfC* debería ser el gen responsable del crecimiento de *A. fumigatus* en esas condiciones. Además, curiosamente la transcripción de *zrfC* es divergente con respecto a la del gen *aspf2*, que codifica el antígeno inmunodominante Asp2, cuya expresión sólo ocurre en medios limitantes en zinc (Segurado *et al.*, 1999). En definitiva, todo esto parece indicar que tanto *zrfC* como *aspf2* podrían ser necesarios para el crecimiento de *A. fumigatus* en medios alcalinos limitantes en zinc. Éste es el ambiente que el hongo encuentra cuando crece en los tejidos de un hospedador susceptible y, por tanto, estos genes podrían ser esenciales en virulencia.

2. Objetivo principal

Demostrar que los genes *zrfC* y *aspf2* constituyen el sistema de adquisición de zinc de *A. fumigatus* que opera en medios alcalinos limitantes en este metal

3. Objetivos experimentales específicos

1. Aislar los genes y los ADNc de *zrfC* y *aspf2*.
2. Comprobar que el gen *zrfC* codifica una proteína transportadora de zinc mediante experimentos de complementación en mutantes adecuados de *S. cerevisiae*.
3. Analizar la expresión de los genes *zrfC* y *aspf2* a nivel transcripcional y desentrañar la regulación de la misma.
4. Determinar la función de los genes *zrfC* y *aspf2* en la adquisición de zinc en *A. fumigatus*, especialmente en medios alcalinos extremadamente limitantes en zinc.

5. Investigar la relevancia individual de cada uno de los transportadores ZrfA, ZrfB y ZrfC en la adquisición de zinc en medios ácidos y alcalinos

4. Resultados

1. El gen *zrfC* codifica un transportador ZIP con posibles dominios de unión de zinc. El gen *zrfC* de *A. fumigatus* codifica una proteína perteneciente a la familia ZIP de transportadores de zinc. El perfil hidropático de esta proteína revela que presenta 9 dominios hidrófobos que posiblemente corresponden a regiones transmembrana. Además, la región transmembrana situada en el extremo N-terminal parece corresponder a un péptido señal que presumiblemente es eliminado por la peptidasa señal. Por tanto, la proteína madura presentaría 8 regiones transmembrana con los extremos N- y C-terminales orientados hacia el exterior celular según la regla del *positive-inside* (von Heijne, 1992). El extremo amino de ZrfC se extendería hacia el espacio periplásmico aproximadamente 200 aminoácidos y presenta cuatro repeticiones CHXHX₅CX₆E/D que definen posibles motivos de unión de zinc. Esta región característica se encuentra únicamente en transportadores fúngicos, por lo que estas proteínas podrían constituir una nueva subfamilia dentro de los transportadores ZIP.

2. La expresión de los genes *zrfC* y *aspf2* ocurre únicamente en medio alcalino limitante en zinc. La presencia de seis sitios de unión de PacC (PR) y tres posibles sitios de unión de ZafA (ZR) en la región promotora compartida por los genes *zrfC* y *aspf2* hacía suponer que podrían estar sometidos a una doble regulación a nivel transcripcional por pH y por disponibilidad de zinc. Con la intención de comprobarlo, se estudió la expresión de estos genes mediante Northern-blot y se observó que su transcripción sólo ocurría en medio alcalino limitante en zinc. Este hecho reafirmaba la hipótesis de que los genes *zrfC* y *aspf2* podrían participar en la adquisición de zinc en medios alcalinos.

3. ZrfC actúa como un transportador de zinc en medios alcalinos y su actividad transportadora necesita del extremo N-terminal para ser plena. Para determinar si ZrfC es un transportador de zinc que opera en medios alcalinos se realizó, en primer lugar, la complementación de la cepa ZHY3 de *S. cerevisiae* (*zrt1Δzrt2Δ*). Esta cepa tiene delecionados en los genes *ZRT1* y *ZRT2* que codifican los transportadores ZIP de membrana plasmática propios de la levadura y es incapaz de crecer en medios ácidos limitantes en zinc (Zhao and Eide, 1996b). Se comparó la capacidad de crecimiento de la cepa silvestre, en medios ácidos y alcalinos, limitantes y no limitantes en zinc, con la de cepas derivadas de ZHY3 que expresaban, respectivamente, los genes *zrfC*, *zrfA*, *zrfB*, *ZRT1* y una versión truncada de *zrfC*, que presentaba una deleción en la región codificante de los posibles motivos de unión de zinc del extremo amino de la proteína (*zrfC*^{NΔ}). Todos los genes se expresaron en un plásmido centromérico bajo el control del promotor de

ZRT1. La expresión de los genes *zrfA*, *zrfB* y *ZRT1* no mejoraba la capacidad de crecimiento de la levadura en medio alcalino. Por el contrario, la expresión de *zrfC* mejoraba y aceleraba el crecimiento de la levadura en medio alcalino limitante en zinc, en comparación con la cepa silvestre. Además, la expresión de *zrfC*^{NA} restauraba el crecimiento de la levadura al nivel del silvestre únicamente en medios alcalinos no limitantes en zinc. Por tanto, ***zrfC* codifica un transportador de zinc que opera en medios alcalinos limitantes en zinc y necesita el extremo amino para poder realizar plenamente esta función transportadora.**

Seguidamente se procedió a investigar la función de *zrfC* en el crecimiento de *A. fumigatus* en medios ácidos y alcalinos limitantes en zinc. Para ello se construyeron los mutantes *zrfCΔ* (AF431) y *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* (AF251) y se estudió su capacidad de crecimiento en comparación con el silvestre y con el mutante *zrfAΔzrfBΔ* (AF10). Se observó que el triple mutante era incapaz de crecer en cualquier condición limitante de zinc, que *zrfC* era dispensable para el crecimiento en medio ácido limitante en zinc en presencia de *zrfA* y *zrfB*, y que éstos eran dispensables para el crecimiento en medio alcalino limitante en zinc en presencia de *zrfC*. Para profundizar en el conocimiento de la función específica de cada transportador, cada uno de los genes se reintrodujo en el locus *pyrG1* de la cepa triple mutante AF2511 (auxotrófica espontánea de uracilo, obtenida a partir de AF251), generando las cepas *zrfA*⁺*zrfBΔzrfCΔ* (AF751), *zrfAΔzrfB*⁺*zrfCΔ* (AF761) y *zrfAΔzrfBΔzrfC*⁺ (AF731). Además, también se reintrodujo el gen *zrfC* delecionado en la región codificante de aproximadamente 170 residuos del extremo N-terminal de la proteína, generando la cepa *zrfAΔzrfBΔzrfC*^{NA} (AF791). Tras analizar el crecimiento de todos estos mutantes se demostró que **la capacidad de *A. fumigatus* para crecer en medios alcalinos limitantes en zinc reside principalmente en el gen *zrfC* y de manera secundaria en *zrfB*. Además, se demostró que el extremo N-terminal de *ZrfC* es necesario para el crecimiento del hongo** en condiciones extremadamente limitantes en zinc.

4. El gen *aspf2* mejora la capacidad de crecimiento de *A. fumigatus* en medios muy limitantes en zinc, principalmente a pH alcalino. Los genes *zrfC* y *aspf2* mostraron igual patrón de transcripción en todas las condiciones testadas. Considerando que *zrfC* codifica un transportador encargado de la adquisición de zinc en medios alcalinos limitantes en este metal, era probable que *aspf2* participara de alguna manera en la homeostasis del zinc de *A. fumigatus* en esas mismas condiciones ambientales. Para estudiar esta posibilidad se construyó el mutante *aspf2Δ* (AF811) y se analizó su capacidad de crecimiento en medios ácidos y alcalinos limitantes y no limitantes en zinc. Así se observó que, sorprendentemente, el mutante *aspf2Δ* crecía peor que la cepa silvestre en condiciones muy limitantes de zinc tanto a pH ácido como alcalino, si bien la cantidad de zinc requerida para restaurar el crecimiento óptimo era diez veces mayor en medio alcalino que en medio ácido. Por tanto, **la expresión de *aspf2* debe ser requerida a niveles muy bajos (no detectables por Northern-blot) para el crecimiento óptimo del hongo en**

medios ácidos extremadamente limitantes en zinc, mientras que se requiere su expresión a niveles elevados para el crecimiento óptimo de *A. fumigatus* en medios alcalinos muy limitantes en zinc.

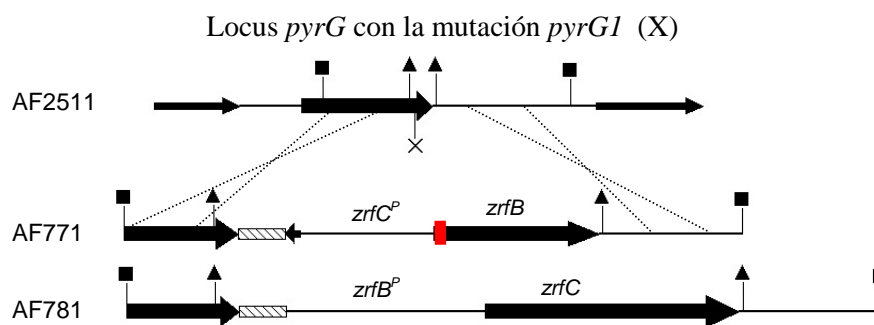
5. La expresión de *zrfC* y *aspf2* está regulada a nivel transcripcional por los factores ZafA y PacC. El patrón de expresión de los genes *zrfC* y *aspf2* y la presencia en su región promotora común de tres sitios ZR y seis sitios PR indicaban que la transcripción de estos genes debía estar co-regulada por los factores ZafA y PacC. Para demostrarlo, se analizó la transcripción de estos genes mediante Northern-blot en la cepa $\Delta zafA$ (AF17) y en las cepas mutantes *pacC* que mimetizan crecimiento a pH alcalino (AF58) y ácido (AF60). El patrón de expresión de *zrfC* y *aspf2* en todos estos mutantes demostró que, efectivamente, **la transcripción de estos genes está controlada por ZafA y PacC.** Sin embargo, contrariamente a lo descrito en el modelo de regulación por PacC (Peñalva and Arst, 2004), el patrón de expresión que mostraban estos genes sugería que PacC podría estar reprimiendo la expresión de los genes *zrfC* y *aspf2* a pH ácido, en lugar de activarla a pH alcalino. Con el objeto de investigar esta posibilidad, se eliminaron los sitios de unión de PacC a este promotor mediante mutagénesis puntual dirigida, tomando en consideración el trabajo realizado por Espeso *et al.* (1997). De esta forma los seis sitios 5'-GCCARG-3' (PR) del promotor *zrfC-aspf2* (abreviado como za^p) fueron convertidos en 5'-GCGTRG-3' (promotor za^{p*}). A continuación se expresaron los genes *zrfC* y *aspf2* bajo el control del promotor za^{p*} , en el locus *pyrG1* de la cepa AF52 (*zrfC* Δ auxotrófica espontánea de uracilo), y en el locus *pyrG1* de la cepa AF861 (*aspf2* Δ auxotrófica espontánea de uracilo), respectivamente, generando las cepas AF801 ($za^{p*} \rightarrow zrfC^+$) y AF891 ($za^{p*} \rightarrow aspf2^+$). El análisis de la expresión de *zrfC* en AF801 y de *aspf2* en AF891 demostró que se transcribían en medios limitantes en zinc, tanto a pH ácido como alcalino, al mismo nivel que el silvestre lo hace en medio alcalino limitante en zinc. De esto se deduce que **PacC debe ser el responsable de inhibir la transcripción de estos genes a pH ácido y que es irrelevante en la transcripción a pH alcalino.**

Figure S1. Phylogenetic tree of the ZIP family of zinc transporters. It is a N-J bootstrapped tree that was created using Clustal X by setting the number of bootstrap trials (N) to 1000. Most of the proteins in the tree cluster into four main branches that correspond with the ZIP-I, ZIP-II, LIV-1 and *gufA* subfamilies of ZIP transporters, as described previously (40). However, the ZrfC-like proteins cluster in a separated branch of the tree closely related to the ZIP-I proteins. The corresponding accession number and organism for each protein are given. The formal name of the protein is also showed when it applies. Specific names has been abbreviated as follows: Acp = *Ajellomyces capsulatus*, Acv= *Aspergillus clavatus*, Afu = *Aspergillus fumigatus*, And = *Aspergillus nidulans*, Aoz = *Aspergillus oryzae*, Ath = *Arabidopsis thaliana*, Bta = *Bos taurus*, Cab = *Candida albicans*, Cco = *Campylobacter coli*, Cel = *Caenorhabditis elegans*, Cgb = *Chaetomium globosum*, Cim = *Coccidioides immitis*, Cli = *Chlorobium limicola*, Dha = *Debaryomyces hansenii*, Dme = *Drosophila melanogaster*, Dre = *Danio rerio*, Hs = *Homo sapiens*, Mac = *Methanosarcina acetivorans*, Mgr = *Magnaporthe grisea*, Mmu = *Mus musculus*, Ncr = *Neurospora crassa*, Pan = *Podospira anserina*, Pbr = *Paracoccidioides brasiliensis*, Pno = *Phaeosphaeria nodorum*, Pst = *Pichia stipitis*, Sce = *Saccharomyces cerevisiae*, Sly = *Solanum lycopersicum* and, Ssc = *Sclerotinia sclerotiorum*.

5. Información adicional

Además de los experimentos mostrados en el artículo anterior, también se investigó si la distinta relevancia que presentaban los genes *zrfB* y *zrfC* en el crecimiento de *A. fumigatus* en condiciones limitantes de zinc (es decir, *zrfB* es fundamental para el crecimiento a pH ácido y *zrfC* lo es a pH alcalino) era exclusivamente debida a su diferente patrón de expresión según el pH ambiental, o si, además, las proteínas que codifican mostraban distinta funcionalidad en cada pH. Para ello, se construyeron dos cepas mutantes distintas: una que expresaba en el locus *pyrG1* de la cepa triple mutante AF2511 el gen *zrfB* bajo el control del promotor de *zrfC* (AF771) y, del mismo modo, otra que expresaba el gen *zrfC* bajo el control del promotor de *zrfB* (AF781) (Fig. 3Ra). A continuación, se realizó un estudio transcripcional para comprobar que la expresión de los genes revertidos se correspondiera con la regulación propia de cada promotor (Fig. 3Rb). Como puede observarse, la cepa AF771 expresaba el gen *zrfB* en las mismas condiciones en las que un silvestre expresa el gen *zrfC*, es decir, únicamente se expresaba en pH alcalino limitante en zinc. Por otra parte, el mutante AF781 expresaba el gen *zrfC* en las mismas condiciones en las que un silvestre expresa el gen *zrfB*, es decir, presentaba una expresión muy alta a pH ácido limitante en zinc, y muy baja a pH alcalino. Además, en concordancia con la regulación del silvestre, ninguna cepa expresó estos genes en condiciones de disponibilidad de zinc (dato no mostrado en la figura). Se incluyeron en el estudio las cepas AF761 (*zrfAΔzrfB⁺zrfCΔ*) y AF731 (*zrfAΔzrfBΔzrfC⁺*) con el doble propósito de comprobar también la expresión de los genes *zrfB* y *zrfC* en estas cepas y de utilizarlas como control interno de expresión de estos genes en el locus *pyrG*. Tal y como se esperaba, todas las cepas mostraron el patrón de expresión correspondiente al promotor que regulaba cada gen. No obstante, observando detalladamente la figura se puede apreciar que los transcritos expresados por las cepas mutantes presentaban distintos tamaños con respecto a los de la cepa silvestre. En el caso de las cepas AF771 y AF781, éste era un hecho esperado, puesto que el sitio de inicio de la transcripción de los genes *zrfB* y *zrfC* es lo suficientemente diferente para advertir esta diferencia de tamaño. El sitio aproximado de inicio de la transcripción del gen *zrfB* se encuentra 268 nucleótidos aguas arriba del codón ATG (Vicentefranqueira *et al.*, 2005), mientras que el del gen *zrfC* ha sido localizado en este trabajo en la posición -32 con respecto al codón ATG. Es por ello que el gen *zrfC* expresado bajo el control de promotor de *zrfB* presentaba un transcrito de mayor tamaño que el gen *zrfC* silvestre, mientras que el gen *zrfB* expresado bajo el control del promotor de *zrfC* se transcribía en un ARNm más corto que el del gen silvestre. Por su parte, el tamaño ligeramente mayor que presentaba el ARNm del gen *zrfB* expresado en la cepa AF761 (aproximadamente 50 nucleótidos más) también era esperable, a pesar de encontrarse la región codificante de *zrfB* bajo el control de su propio promotor, debido a que la ORF del gen tenía fusionada en su extremo 5' la región codificante del epítipo HA, de 42 nucleótidos.

a)



b)

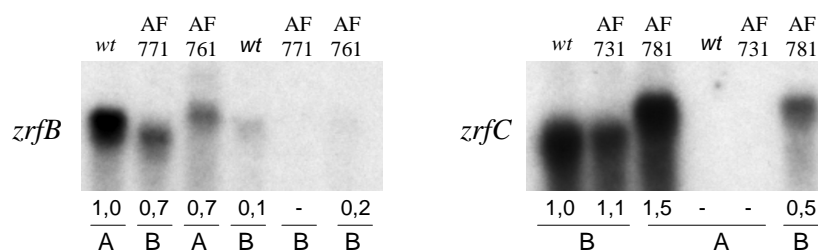


Fig. 3R. a) Construcción de las cepas de *A. fumigatus* que expresaban el gen *zrfB* bajo el promotor de *zrfC* (AF771) o el gen *zrfC* bajo el control del promotor de *zrfB* (AF781), en el locus *pyrG* de la cepa triple mutante AF2511. La región roja en el extremo 5' de la ORF del gen *zrfB* señala la zona codificante del epítipo HA. En ambas cepas se comprobó que el proceso de recombinación había ocurrido correctamente mediante Southern-blot (no mostrado). **b)** Análisis de la expresión por Northern-blot de los genes *zrfB* (en las cepas AF771 y AF761) y *zrfC* (en las cepas AF781 y AF731). En todos los casos el hongo se cultivó en medio ácido (A) o alcalino (B). En la parte inferior de los paneles se indica la intensidad relativa de cada señal normalizada adecuadamente. Los medios se inocularon con 10^5 conidios/mL y se incubaron 24 horas a 37° C.

Sin embargo, la cuestión más difícil de explicar era la menor cantidad de ARNm detectado en las cepas AF771 y AF761 con respecto a la cepa silvestre, ya que en ésta última el gen *zrfB* se encuentra bajo el control de su propio promotor. Tomando en consideración que la cantidad de transcrito del gen *zrfC* detectado en la cepa AF731 era similar a la de la silvestre, no se puede presumir que el nivel de expresión de *zrfB* en el locus *pyrG* difiera del nivel en el locus natural del gen. Una posibilidad razonable para explicar esta diferencia sería que el ARNm del gen *zrfB* en las cepas AF761 y AF771 fuera menos estable que el ARNm del gen silvestre. Ello podría ser debido a que el transcrito del gen en los mutantes contiene los nucleótidos correspondientes a la ORF del epítipo HA, por lo que la estructura secundaria del ARNm será diferente. Para intentar conocer la factibilidad de esta hipótesis, se realizó la predicción de la estructura secundaria de los extremos 5' de los ARN mensajeros correspondientes a los genes *zrfB* y *zrfB*-HA utilizando la herramienta CONTRAfold (*Conditional Training for RNA secondary structure prediction*), disponible online en la página <http://www.contra.stanford.edu/contrafold/server.html> (Fig. 4R).

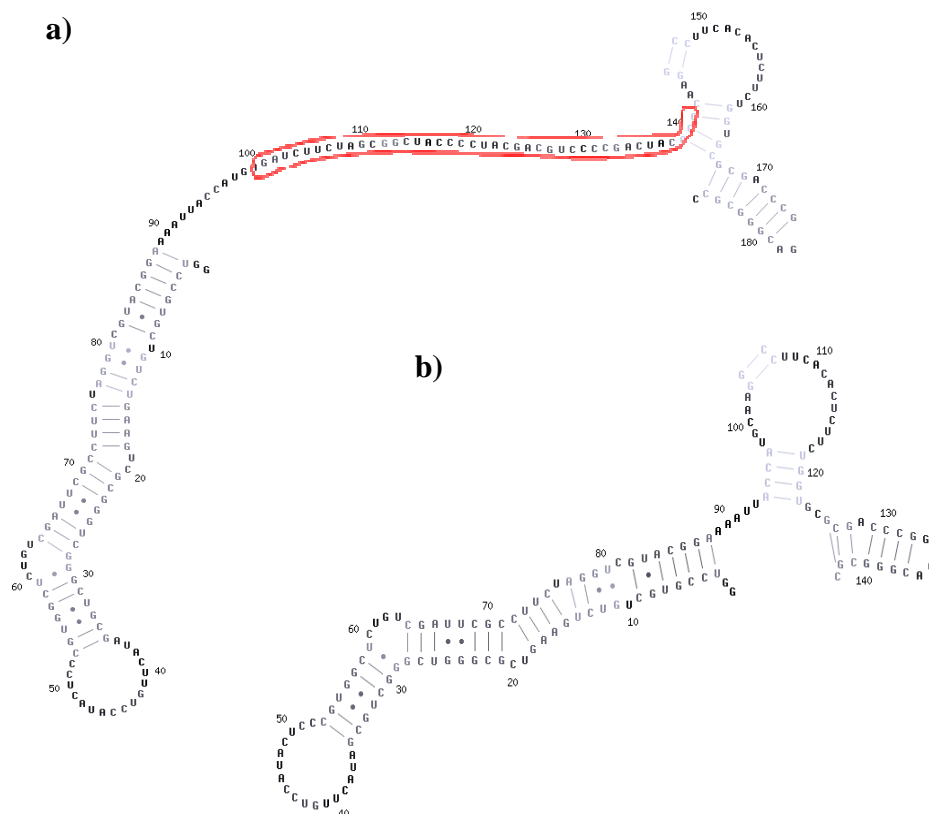


Fig. 4R: Predicción de la estructura secundaria formada por el extremo 5' de los ARN mensajeros transcritos a partir de los genes *zrfB-HA*, expresado por las cepas AF761 y AF771 **(a)** y *zrfB* silvestre **(b)**. La línea roja enmarca la secuencia nucleotídica que codifica el epítipo HA.

Como puede observarse en la figura, el ARNm transcrito del gen mutante presenta una región abierta que coincide con los nucleótidos codificantes del epítipo HA, por tanto es muy probable que este ARN sea menos estable que la versión silvestre.

Una vez analizada la expresión de los genes, se procedió a estudiar la capacidad de crecimiento de estas cepas en medios sólidos ácidos y alcalinos, no suplementados y suplementados con cantidades crecientes de zinc, comparándolo con el crecimiento de las cepas AF761 y AF731, que expresan los genes *zrfB* y *zrfC*, respectivamente (Fig. 5R). La cepa AF771 creció peor que la cepa AF761 a pH ácido, incluso con un suplemento de 50 μ M de zinc. No obstante, con este suplemento AF771 era capaz de crecer, mientras que el triple mutante *zrfA* Δ *zrfB* Δ *zrfC* Δ no (ver figura 4 en el artículo 2). Esto sugiere una vez más que la capacidad promotora del promotor de *zrfC* no está totalmente reprimida en medios ácidos limitantes en zinc y permite que se produzca un bajísimo nivel basal de transcripción no detectable por Northern-blot. Por su parte, la cepa AF781 a pH ácido creció peor que la cepa AF761. Es más, AF781 creció al mismo nivel que AF771.

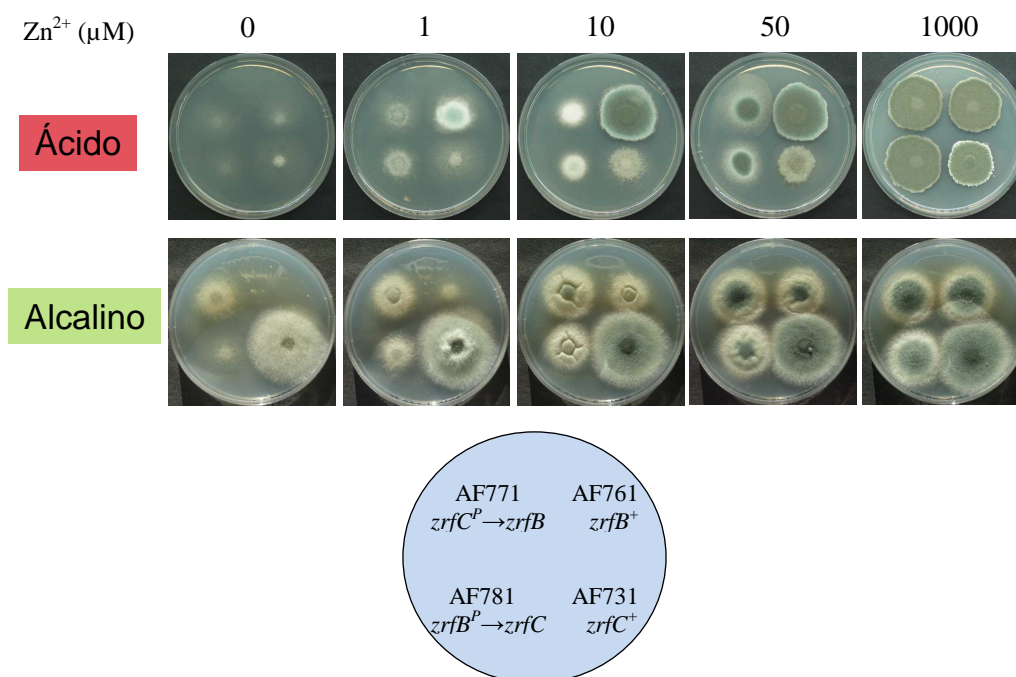


Fig. 5R. Crecimiento de las cepas AF771, AF761, AF781 y AF731 en medio ácido (SDAE) y alcalino (SDNE) sin y con cantidades crecientes de suplemento de zinc. Las placas se sembraron con 10^3 conidios/cepa y se incubaron a 37° C en ambiente húmedo 3, en medio alcalino ó 5 días, en medio ácido.

Esto quiere decir que la poca cantidad de proteína ZrfB que se debe estar produciendo en AF771 debe ser capaz de transportar zinc más eficazmente que la proteína ZrfC expresándose en altos niveles. De esto se puede concluir que **el transportador ZrfB es mucho más eficaz que ZrfC en la adquisición de zinc a pH ácido.**

Sin embargo, a pH alcalino la cepa AF771 creció peor que la cepa AF731, lo que sugiere que **el transportador ZrfC es más eficaz que el ZrfB obteniendo zinc de medios alcalinos.** No obstante, la cepa AF771 a pH alcalino creció sensiblemente mejor que AF761, lo que indica que ZrfB también puede obtener zinc de medios alcalinos limitantes en zinc, aunque mucho menos eficientemente que ZrfC. Además, el hecho de que AF781 no sea capaz de crecer como AF731 a pH alcalino, demuestra que el transportador ZrfC se debe expresar mucho a pH alcalino limitante en zinc para que el hongo pueda alcanzar su tasa máxima de crecimiento en esas condiciones.

En resumen, tanto la regulación de la transcripción determinada por los promotores de *zrfB* y *zrfC* en función de la disponibilidad de zinc y del pH ambiental, como la diferente funcionalidad de las proteínas ZrfB y ZrfC (ZrfB funciona mejor a pH ácido y ZrfC a pH alcalino) son claves para explicar la capacidad de *A. fumigatus* para adaptarse a crecer en medios ácidos y alcalinos limitantes en zinc.

CAPÍTULO III:

Importancia de la capacidad de adquisición de zinc a partir de medios alcalinos extremadamente limitantes en zinc en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*

Los resultados obtenidos en los capítulos anteriores han demostrado que la capacidad de *A. fumigatus* para crecer en ambientes alcalinos muy limitantes en zinc reside principalmente en el gen *zrfC*. Además, el gen *aspf2* también es necesario para el crecimiento óptimo a pH alcalino extremadamente limitante en zinc. Como ya se comentó en la introducción general de esta memoria, estas condiciones ambientales son las mismas que *A. fumigatus* encuentra cuando crece en el tejido pulmonar y causa aspergilosis pulmonar invasiva. Por tanto, es muy probable que estos genes sean necesarios para el crecimiento del hongo en tejido vivo y, consecuentemente, para la virulencia de *A. fumigatus*. Por consiguiente, para investigar esta posibilidad primero se obtuvieron cepas prototróficas *pyrG*⁺ e isogénicas respecto a la cepa silvestre, posteriormente se analizó la capacidad de crecimiento de estas cepas en suero y se determinó la capacidad de germinación y, finalmente, se realizaron ensayos de virulencia en ratones inmunosuprimidos.

1. Construcción de cepas prototróficas e isogénicas respecto a *pyrG*

Para evitar posibles efectos sobre el crecimiento de cepas mutantes de *A. fumigatus* asociados con la expresión del marcador de selección *pyrG* en un locus ectópico, que pudieran alterar la capacidad de crecimiento de estas cepas en los tejidos vivos y, por tanto, afectar a su virulencia, se construyeron las cepas isogénicas *pyrG*⁺ *zrfC*Δ, *zrfA*Δ*zrfB*Δ, *zrfA*Δ*zrfB*Δ*zrfC*Δ, *zrfA*Δ*zrfB*Δ*zrfC*Δ^{NA}, *zrfA*Δ*zrfB*Δ*zrfC*⁺ y *aspf2*Δ. Para ello, las correspondientes cepas *pyrG*⁻ con la mutación *pyrG1* (ver materiales y métodos) se transformaron con un fragmento de ADN de 1238 pb diseñado para revertir la mutación puntual *pyrG1* (obtenido del plásmido pPYRG* con la digestión EcoRI/EcoRI) (Fig. 6R).

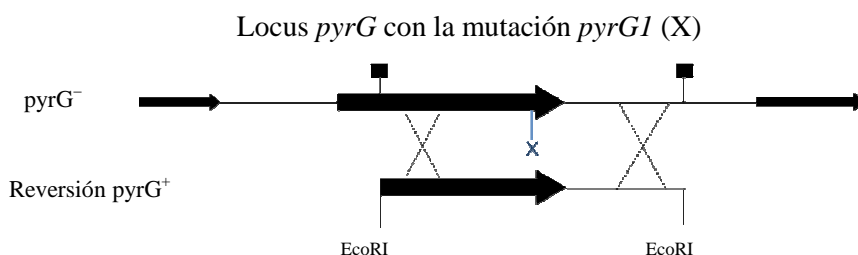


Fig. 6R. Construcción de las cepas prototróficas e isogénicas respecto a *pyrG*.

Las cepas prototróficas seleccionadas en medio AMMH sin suplemento de uracilo/uridina se analizaron mediante Southern-blot, utilizando como sonda el mismo ADN transformante para descartar que hubieran ocurrido inserciones no deseadas en otros puntos del genoma. Estas cepas isogénicas fueron las utilizadas para realizar los estudios de virulencia.

2. Crecimiento en suero

El suero de los mamíferos inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Gifford *et al.*, 2002), incluyendo el de algunos de los patógenos fúngicos más comunes, como *C. albicans* (Minn *et al.*, 1997). Sin embargo, una particularidad de *A. fumigatus* es su capacidad para crecer en concentraciones relativamente altas de suero humano o suero bovino, siendo capaz de crecer en sueros al 80% (Gifford *et al.*, 2002).

Los medios de cultivo preparados con sueros son medios muy complejos que presentan una serie de características por las cuales se asemejan más a los tejidos vivos que los medios de cultivo sintéticos. Las dos características más relevantes para nuestros estudios son: (1) contienen proteínas capaces de secuestrar metales con gran afinidad, de manera que su biodisponibilidad es muy limitada para los microorganismos, y (2) tienen pH alcalino, el cual se mantiene constante durante el tiempo de incubación (Gifford *et al.*, 2002). En este sentido, el crecimiento de *A. fumigatus* en estos medios podría ser más parecido al crecimiento del hongo en los tejidos vivos que el crecimiento que exhibe cuando crece en los medios definidos usados hasta ahora (Moreno *et al.*, 2007b). Esta es la razón por la que se decidió, previamente a la realización de los estudios de virulencia en ratones, analizar la capacidad de crecimiento de las cepas mutantes en medios con suero bovino fetal (FBS) y suero bovino (BS), cada uno al 10% y al 50% sin suplemento y con suplementos crecientes de zinc (Fig. 7R).

En los **medios FBS y BS al 10%** todas las cepas crecieron igual que el silvestre, incluso sin suplemento de zinc, excepto el triple mutante AF721 (*zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*) y el doble mutante AF48 (*zrfAΔzrfBΔ*). El triple mutante sólo era capaz de crecer cuando el medio era suplementado con 1000 μM de zinc, aunque incluso en este caso en el medio BS crecía peor que la cepa silvestre. El doble mutante crecía menos que el silvestre en el medio BS limitante en zinc, efecto que no era observable en el FBS. Curiosamente el mutante AF731 (*zrfAΔzrfBΔzrfC⁺*), que es genéticamente equivalente y que había mostrado la misma capacidad de crecimiento en los medios definidos, crecía igual que el silvestre en esas mismas condiciones. En la comparación entre los medios se observa que el crecimiento de las distintas cepas de *A. fumigatus* estaba más restringido en el medio BS que en el FBS. Además, el medio BS parecía ser más limitante en zinc, ya que el mutante triple creció peor en él que en el FBS con el mismo suplemento de 1000 μM.

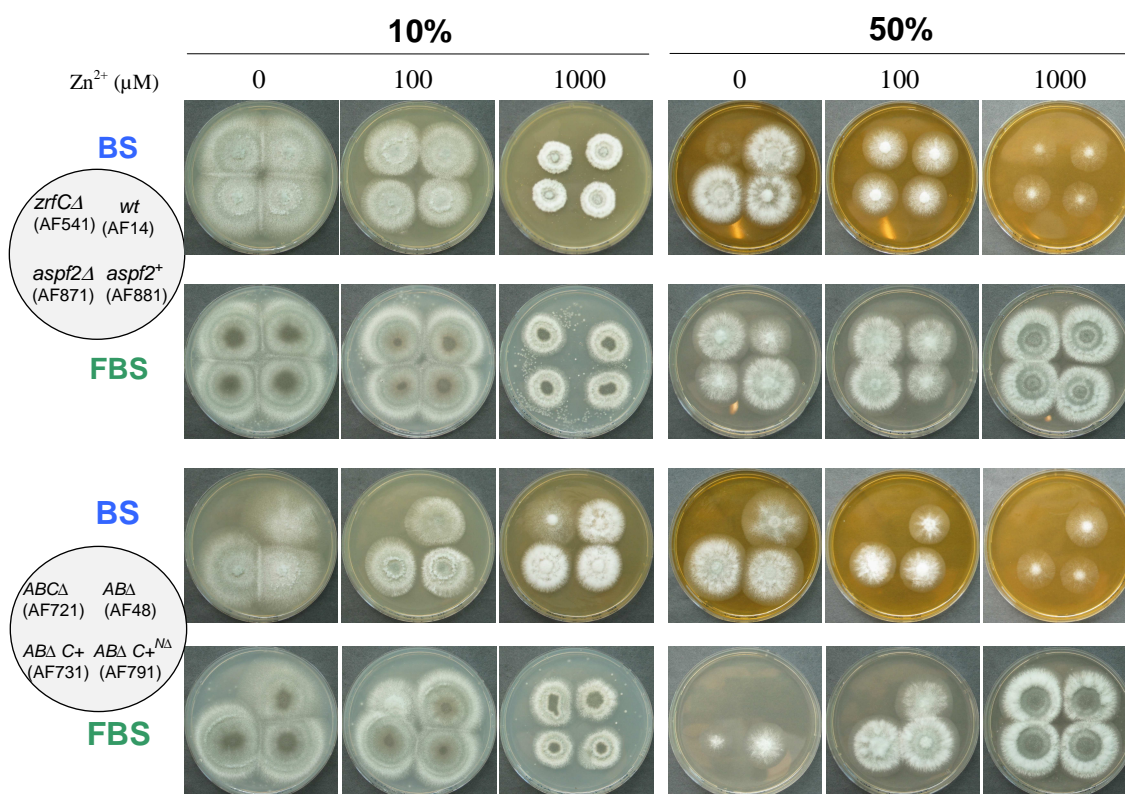


Fig. 7R. Crecimiento de la cepa silvestre (AF14) y de las cepas mutantes isogénicas en suero bovino (BS) y suero bovino fetal (FBS) al 10% y al 50%, sin suplemento de zinc y con suplementos de 100 y 1000 μM de zinc. Las placas se sembraron con 10³ conidios/cepa y se incubaron a 37° C en ambiente húmedo durante 3 días en sueros al 10% ó 5 días en sueros al 50%.

En el **medio FBS al 50%** todas las cepas crecieron de forma similar excepto el mutante doble *zrfAΔzrfBΔ*, que de nuevo crecía peor que la cepa genéticamente equivalente AF731, y el triple mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*, que no era capaz de crecer a menos que el medio se suplementara con 1000 μM de zinc. Por su parte, en el **medio BS al 50%**, todas las cepas crecían igual que el silvestre, excepto el mutante simple *zrfCΔ*, que necesitaba un suplemento de 100 μM para poder crecer, el triple mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*, que no era capaz de crecer ni siquiera con el suplemento de 1000 μM de zinc, y el doble mutante *zrfAΔzrfBΔ*, que una vez más crecía ligeramente peor que la cepa AF731, aunque en este medio el defecto era más leve. Estos resultados se correlacionaban bien con los obtenidos previamente en los ensayos *in vitro*, aunque ni el gen *aspf2* ni el extremo amino de la proteína ZrfC parecían tener la relevancia para el crecimiento en suero que previamente habían mostrado en los medios definidos. Además en el BS, las cepas con genotipo silvestre mostraron constancia entre ellas en su patrón de crecimiento, por lo que este medio parecía más adecuado que el FBS para estudiar la capacidad de crecimiento de las cepas en relación con la adquisición de zinc. En resumen, de este análisis se concluyó que:

(1) el gen *aspf2* es irrelevante para el crecimiento en suero, (2) el gen *zrfC* es necesario para el crecimiento en medio BS 50% (sin suplemento de zinc), (3) el extremo amino de la proteína ZrfC parece irrelevante para permitir al hongo alcanzar su máxima capacidad de crecimiento en BS y, (4) los genes *zrfA* y *zrfB* también deben contribuir a la adquisición de zinc a partir de suero.

A pesar de que las deficiencias en crecimiento que presentaron los mutantes *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* (AF721) y *zrfCΔ* (AF541) parecían ser debidas a la limitada biodisponibilidad de zinc que existe en los sueros, también habría que tener en cuenta que los sueros son medios limitantes en otros metales. Por ejemplo, ha sido descrito que la producción de sideróforos es fundamental para que *A. fumigatus* pueda crecer en los sueros, ya que existe una gran limitación de hierro en ellos (Hissen *et al.*, 2004). Para investigar esta posibilidad, se analizó la capacidad de crecimiento de los mutantes en medios BS preparados a distintas concentraciones y con suplementos de zinc, cobre y/o hierro para comprobar si alguno de esos metales mejoraba el crecimiento de las cepas que habían mostrado deficiencias en el experimento anterior (Fig. 8R).

En esta figura se puede apreciar como el incremento en la concentración del suero inhibe el crecimiento de *A. fumigatus*. Sin embargo, en concordancia con lo anteriormente descrito, *A. fumigatus* era capaz de crecer en una concentración tan alta como es el 70% de suero, la cual inhibiría el crecimiento de la gran mayoría de los microorganismos. Además, se aprecia que la cepa AF731 crecía igual que el silvestre en todas las condiciones estudiadas, lo que prueba que el gen *zrfC*, y no *zrfA* ni *zrfB*, es el principal responsable de la adquisición de zinc en el medio BS limitante. El mutante AF541 crecía menos que el silvestre en BS al 40% sin suplemento de zinc, y no era capaz de crecer en el medio al 70% sin zinc. Pero su capacidad de crecimiento se restablecía al nivel del silvestre al añadir zinc al medio. Sorprendentemente la adición de cobre también restauraba parcialmente su capacidad de crecimiento aunque sólo en BS al 40%, mientras que la adición de hierro mejoraba ligeramente el crecimiento de todas las cepas, pero no restauraba el crecimiento del mutante AF541. Por último, la cepa triple mutante (AF721) sólo crecía en BS 10% con 100 μ M de zinc y en BS 40% con 1000 μ M de zinc. En resumen, de estos estudios se puede concluir que el gen *zrfC* es necesario para el crecimiento de *A. fumigatus* en suero, lo que podrían indicar que este gen es el principal responsable de la adquisición de zinc a partir de los tejidos vivos.

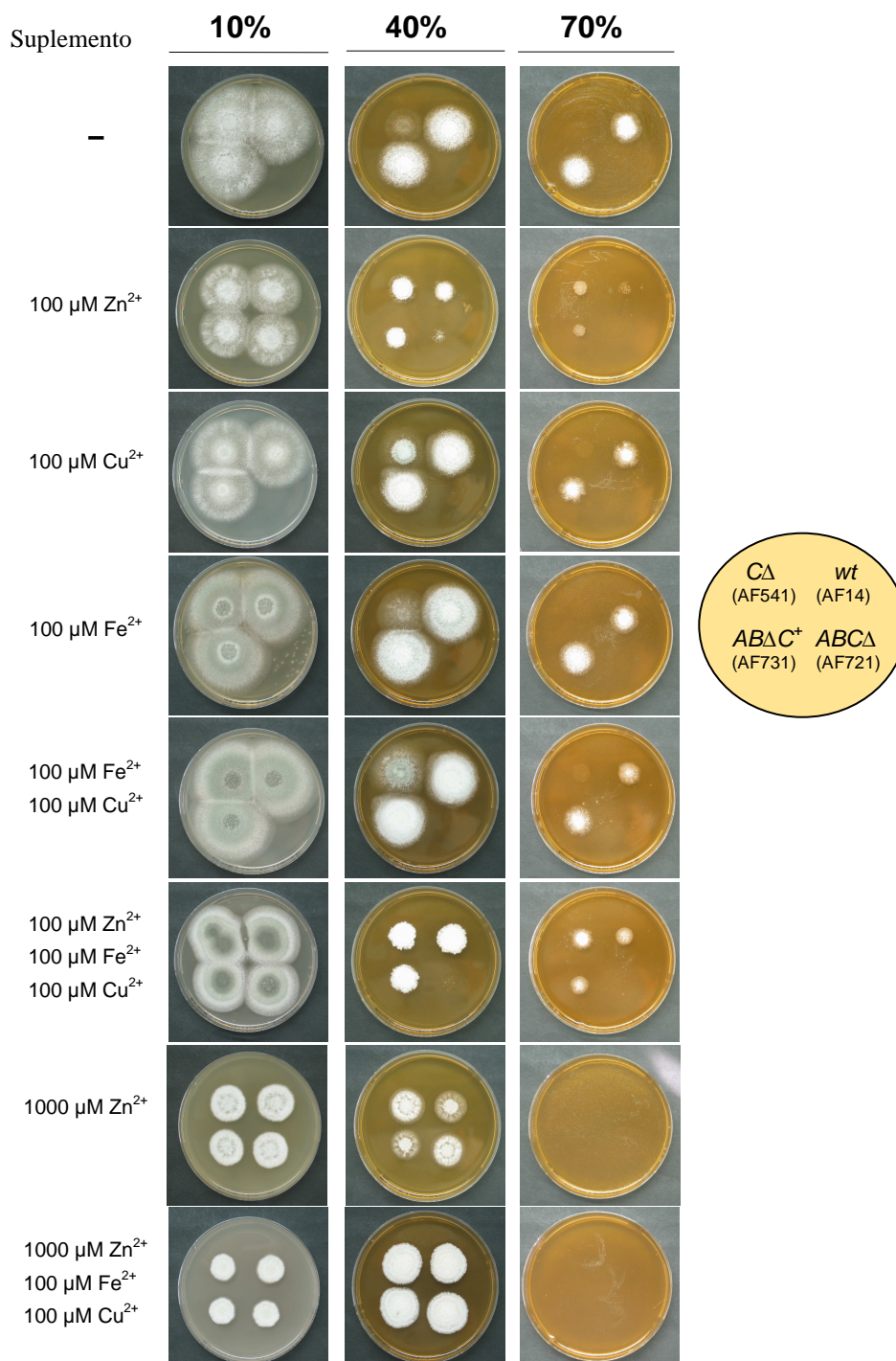


Fig. 8R. Crecimiento de las cepas AF14, AF541, AF721 y AF731 en medios BS al 10%, 40% y 70% sin suplemento o con suplemento de 100 μM zinc, 100 μM hierro y/o 100 μM cobre y 1000 μM zinc, según se indica en cada caso. Las placas se inocularon con 10^3 conidios/cepa y se incubaron a 37° C en ambiente húmedo 3 días en BS al 10% ó 4 días en BS al 40% y 70%.

El descubrimiento de que el cobre era capaz de restaurar parcialmente el crecimiento del mutante *zrfC* Δ en condiciones limitantes de zinc sugería una posible relación entre la homeostasis del zinc y del cobre, otro oligoelemento esencial. Para investigar si la disponibilidad de cobre influye en la expresión de genes relacionados con la homeostasis del zinc, se cultivó la cepa silvestre en medio alcalino limitante en zinc y cobre, y se investigó la transcripción de los genes *zrfB*, *zrfC* y *aspf2* (Fig. 9R).

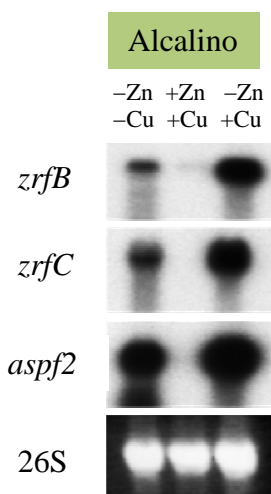


Fig. 9R. Análisis de la expresión por Northern-blot de los genes *zrfB*, *zrfC* y *aspf2* en la cepa silvestre (AF14) cultivada en medio alcalino (SDN) limitante en cobre y zinc, con los suplementos de cobre (10 μ M) y zinc (100 μ M) indicados en cada caso.

En la figura se aprecia claramente cómo la disponibilidad de cobre en el medio incrementa sustancialmente la expresión de genes relacionados con la homeostasis del zinc. El incremento de la expresión de los genes *zrfB* y *aspf2* inducido por el cobre posiblemente mejora la capacidad de obtener zinc a partir del suero del mutante *zrfC* Δ lo que explicaría la capacidad de crecimiento de esta cepa en presencia de cobre. Por tanto, efectivamente existe una relación entre la homeostasis del zinc y del cobre.

3. Relevancia de la adquisición de zinc en germinación

Un factor importante que determina el éxito de la infección y colonización por *A. fumigatus* es su capacidad de germinar en el ambiente del pulmón. En este sentido la infección con conidios de una cepa *zafA* Δ , que no son capaces de germinar en el pulmón, no causa enfermedad (Moreno *et al.*, 2007b). La cepa *zafA* Δ no es capaz de adquirir zinc del ambiente ni de movilizar sus propias reservas intracelulares, ya que no expresa los genes necesarios para ello (ej. *zrfF*), por esta razón esta cepa no crece en ninguna condición limitante de zinc. Sin embargo, las cepas *zrfC* Δ y *zrfA* $\Delta*zrfB* $\Delta*zrfC* Δ no crecen bien en condiciones limitantes en zinc porque no son capaces de adquirir el metal del ambiente pero, al contrario que la cepa *zafA* Δ , sí son capaces de movilizar sus reservas internas de zinc, por lo que los conidios de estas cepas deberían ser capaces de germinar$$

incluso en ambientes limitantes, siempre que procedan de medios ricos en zinc en los que hayan podido formar esta reserva intracelular. Este hecho podría determinar una diferencia entre la virulencia de la cepa *zafAΔ* y las cepas *zrfCΔ* y *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*, puesto que la germinación de los conidios en el pulmón podría causar ciertos daños al hospedador aunque no fueran capaces de formar hifas. Para investigar este aspecto de la fisiología de las cepas, se determinó el porcentaje de germinación de los conidios de estas cepas en medio definido alcalino (SDN) limitante y no limitante en zinc (Fig. 10Ra) y en BS 50% (Fig. 10Rb).

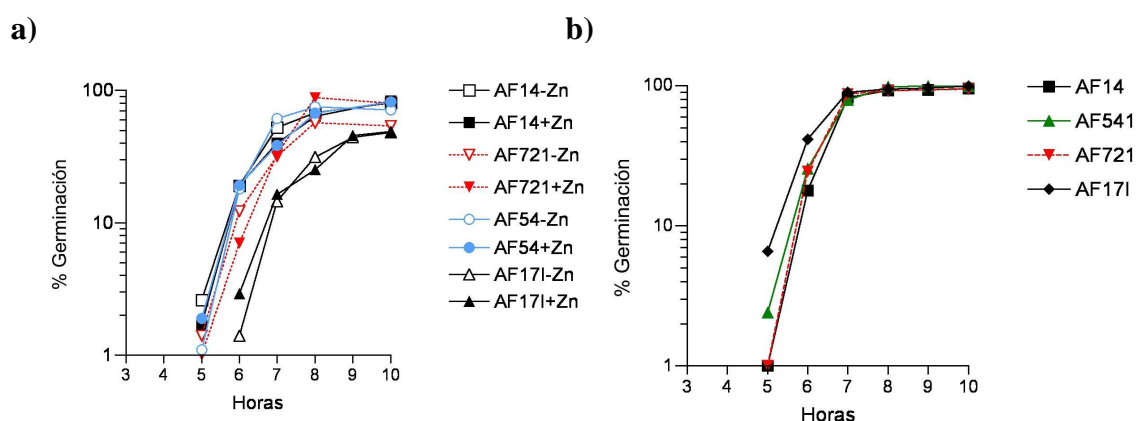


Fig. 10R. Tasa de germinación de las cepas silvestre (AF14), *zrfCΔ* (AF541), *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* (AF721) y *zafAΔ* (AF17I) en medio definido alcalino con (100 μ M) y sin suplemento de zinc (a) y en BS 50% (b). Se inocularon 10^7 conidios/mL de medio y se incubaron a 37° C. A partir de las 4 horas de incubación se calculó el porcentaje de germinación cada hora hasta las 10 horas. Las gráficas se representan en escala semilogarítmica.

Como puede observarse, en BS 50% todas las cepas presentaban la misma capacidad de germinación, alcanzando prácticamente el 100% de porcentaje de germinación. Por otra parte, en el medio definido alcalino los mutantes *zrfCΔ* y *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* germinaban igual que el silvestre (en torno al 80%), mientras que la cepa *zafAΔ* presentaba un retraso en el proceso y tan sólo germinaban el 50% de las esporas. Por tanto, parece que las cepas *zrfCΔ* y *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* deben ser capaces de formar la reserva intracelular de zinc que permite germinar a los conidios. En consecuencia, si las esporas de la cepa *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* fueran capaces de germinar en el pulmón, posiblemente lo harán de forma muy similar a una cepa silvestre, al contrario de los conidios de la cepa *zafAΔ*, que apenas son capaces de germinar en el tejido pulmonar y esta cepa es avirulenta (Moreno *et al.*, 2007b).

4. Importancia de *zrfC* en la virulencia de *A. fumigatus*

Los ensayos de virulencia se realizaron utilizando un **modelo murino de aspergilosis pulmonar invasiva** en ratones inmunosuprimidos con acetato de hidrocortisona y ciclofosfamida, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

En primer lugar, para determinar la relevancia de los genes *zrfA* y *zrfB* en la virulencia de *A. fumigatus*, se realizó un modelo murino infectando los ratones con 10^5 conidios de la cepa AF48 (*zrfAΔzrfBΔ*). Como se puede apreciar en la figura (Fig. 11R) no se encontraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los ratones infectados con la cepa mutante o con la cepa silvestre ($P = 0,748$).

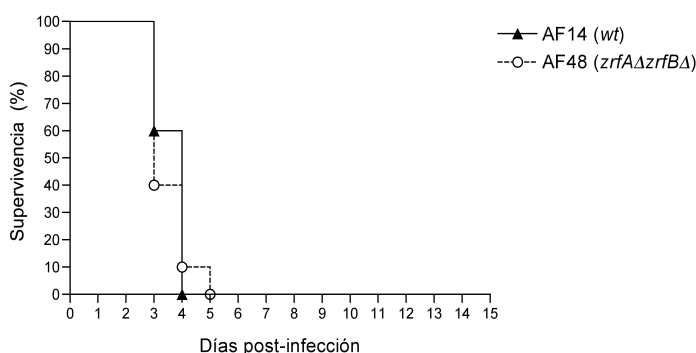


Fig. 11R. Curva de supervivencia de los ratones infectados con 10^5 conidios/ratón de las cepas AF14 y AF48. Cada curva representa la supervivencia de un grupo de 10 ratones.

Además, la carga fúngica presente en los pulmones de estos ratones, estimada mediante determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc) y cantidad de galactomanano (GM) por gramo de tejido, resultó ser similar entre ambas cepas (Tabla 1R). Por tanto, se puede concluir que los genes *zrfA* y *zrfB* no son necesarios para la virulencia de *A. fumigatus*.

| Cepa | Inóculo | ufc/g ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | $\mu\text{g GM/g}$ ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) |
|----------------------------|---------|---|--|
| AF14 (<i>wt</i>) | 10^5 | 10045 ± 2567 | $22,1 \pm 4,7$ |
| AF48 (<i>zrfAΔzrfBΔ</i>) | 10^5 | 11166 ± 4469 | $26,0 \pm 10,3$ |

Tabla 1R. Carga fúngica media presente en los pulmones de los ratones infectados con las cepas AF14 y AF48. La carga fúngica se calculó determinando el número de unidades formadoras de colonias por gramo de pulmón (ufc/g) y la cantidad de galactomanano por gramo de pulmón ($\mu\text{g GM/g}$).

De acuerdo con todos los resultados previos, el gen *zrfC* debería ser el encargado de adquirir el zinc en los tejidos vivos. Para indagar en la función del gen *zrfC* sobre la virulencia de *A. fumigatus*, se ensayó la virulencia de un mutante *zrfCΔ* así como la de un mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* utilizando un inóculo de 10^5 conidios por ratón (Fig. 12Ra). Como se puede apreciar, el mutante *zrfCΔ* presentaba una virulencia significativamente reducida respecto a la cepa silvestre ($P = 0,0008$), disminución que se acentuaba en gran medida en el triple mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* ($P < 0,0001$). Sin embargo, 4 de los 9 de los ratones inmunodeprimidos que mueren a partir del noveno día post-infección (coincidiendo con el día en el que se administra la 5ª dosis de ciclofosfamida) no presentaban carga fúngica alguna, por lo que la muerte de estos ratones no puede ser atribuida a la infección por *Aspergillus* sino más probablemente al estrés asociado a la inmunosupresión. De hecho, gracias a la utilización de grupos control de inmunosupresión (ver materiales y métodos) se pudo constatar que efectivamente algunos ratones morían sin haber sido infectados, debido al estrés que supone la terapia inmunosupresora. Por consiguiente, la disminución de la virulencia del mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* en realidad debe ser mayor de la reflejada en la figura. En cualquier caso, la reintroducción del gen *zrfC* completo restauraba la capacidad patogénica de *A. fumigatus* al nivel del silvestre ($P = 0,132$). Además, la virulencia de una cepa que expresa el gen *zrfC* sin la región codificante de su extremo amino era idéntica que la virulencia de una cepa *zrfCΔ* ($P = 0,857$). Por tanto, el extremo amino de ZrfC era esencial para la funcionalidad de este transportador cuando el hongo crece en tejido vivo.

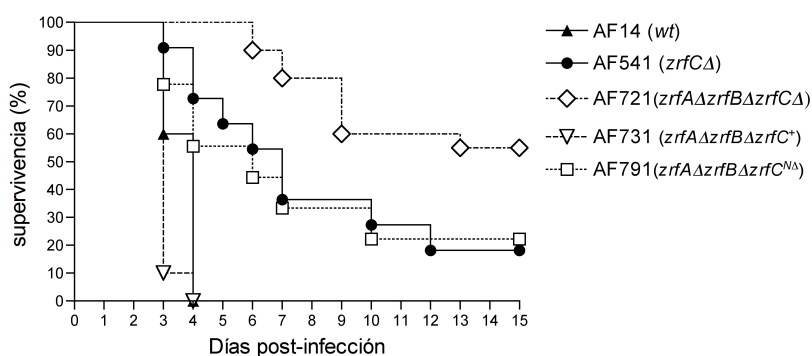


Fig. 12R. Curva de supervivencia de los ratones infectados con 10^5 conidios por ratón de las cepas AF14, AF541, AF721, AF731 y AF791

Un inconveniente de utilizar un inóculo de 10^5 conidios por ratón es que la mayoría de los ratones mueren en un corto periodo de tiempo (entre el 3º y 5º día). En un tiempo de supervivencia tan corto existe la posibilidad de que diferencias en virulencia no se vean tan claramente reflejadas en las curvas de supervivencia. Por ello, con el objetivo de

maximizar las posibles diferencias entre la virulencia de distintas cepas, se realizaron infecciones utilizando un inóculo de 10^4 conidios por ratón (Fig. 13R). Los ratones infectados con la cepa silvestre y con el revertiente AF731 no mostraron diferencia en sus curvas de supervivencia ($P = 0,838$) y, aunque los ratones tardaron más tiempo en morir con este inóculo, ambas cepas mostraron una tasa de supervivencia del 0%. Esto demostraba de nuevo que los genes *zrfA* y *zrfB* no eran necesarios para la virulencia de *A. fumigatus*. Sin embargo, los ratones infectados con el mutante simple *zrfCΔ* mostraron una reducción significativa en su virulencia respecto la cepa revertiente ($P = 0,0004$), al igual que la cepa que expresa el transportador ZrfC sin su extremo amino ($P = 0,0083$) y, a pesar de que las curvas de supervivencia de los ratones infectados con los mutantes AF541 y AF791 mostraban mayor diferencia entre ellas que con el inóculo de 10^5 conidios, su virulencia no era estadísticamente diferente ($P = 0,297$). Por último, la cepa triple mutante era totalmente avirulenta con el inóculo de 10^4 conidios por ratón. En el caso de esta cepa triple mutante se decidió realizar también un inóculo mayor, de 10^6 conidios por ratón, con la intención de verificar si la reducción en virulencia se mantenía incluso con un inóculo tan elevado (Fig. 13R). Como se observa en la figura, la cepa *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* continuaba mostrando una gran reducción en virulencia con este inóculo tan grande de 10^6 conidios por ratón ($P < 0,0001$).

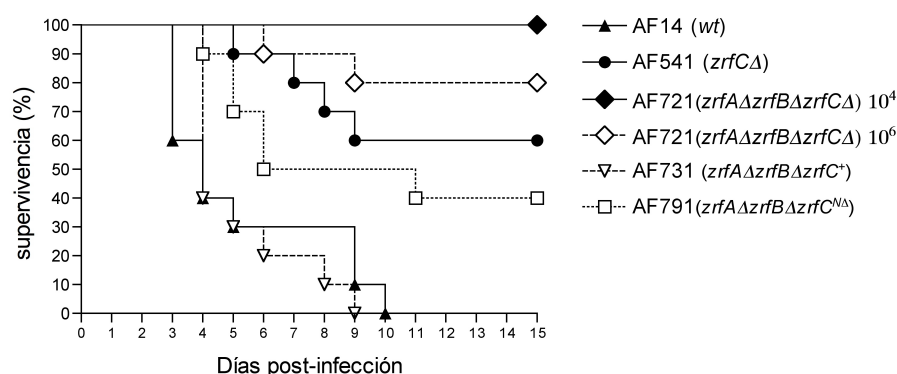


Fig. 13R Curva de supervivencia de los ratones infectados con 10^4 conidios por ratón de las cepas AF14, AF541, AF721, AF731 y AF791 y de los ratones infectados con 10^6 conidios por ratón de la cepa AF721.

Respecto a la carga fúngica estimada para cada caso, en general se observó una buena correlación entre ésta, la virulencia de la cepa y la dosis infectiva utilizada (Tabla 2R). De hecho, la simple observación macroscópica de pulmones extraídos de ratones muertos permitía apreciar el grado de invasión fúngica que las distintas cepas presentaban (Fig. 14R).

| Cepa | Inóculo | ufc/g ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | $\mu\text{g GM/g}$ ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) |
|--|---------|---|--|
| AF14 (<i>wt</i>) | 10^4 | 6728 ± 5371 | $14,1 \pm 7,4$ |
| | 10^5 | 9295 ± 3007 | $20,7 \pm 5,2$ |
| AF541 (<i>zrfCΔ</i>) | 10^4 | 744 ± 1145 | $2,9 \pm 1,6$ |
| | 10^5 | 7838 ± 6207 | $4,1 \pm 3,8$ |
| AF731 (<i>zrfAΔzrfBΔzrfC⁺</i>) | 10^4 | 8911 ± 7035 | $17,8 \pm 8,3$ |
| | 10^5 | 11850 ± 4988 | $28,1 \pm 10,5$ |
| AF721 (<i>zrfAΔzrfBΔzrfCΔ</i>) | 10^4 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| | 10^5 | 161 ± 321 | $1,0 \pm 1,7$ |
| | 10^6 | 789 ± 1049 | $4,5 \pm 2,1$ |
| AF791 (<i>zrfAΔzrfBΔzrfC^{ΔN}</i>) | 10^4 | 5799 ± 3631 | $6,4 \pm 4,5$ |
| | 10^5 | 7658 ± 5654 | $10,4 \pm 11,2$ |

Tabla 2R. Carga fúngica presente en los pulmones de los ratones infectados con las cepas AF14, AF541, AF731, AF721 y AF791. La carga fúngica se calculó determinando el número de unidades formadoras de colonias por gramo de pulmón (ufc/g) y la cantidad de galactomanano por gramo de pulmón ($\mu\text{g GM/g}$).

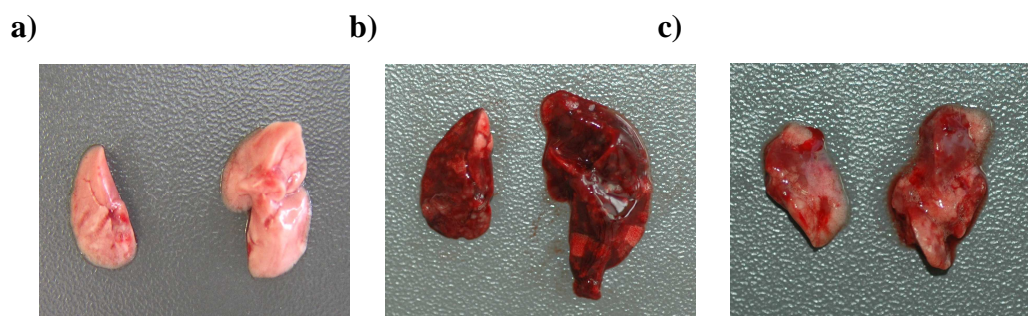


Fig. 14R. Pulmones de ratón recién extraídos de: **a)** un ratón sacrificado del grupo control de inmunosupresión que no presenta carga fúngica, **b)** un ratón infectado con la cepa silvestre que presenta una carga fúngica muy elevada y **c)** un ratón infectado con la cepa mutante *zrfCΔ* que presenta una carga fúngica menor que la del silvestre.

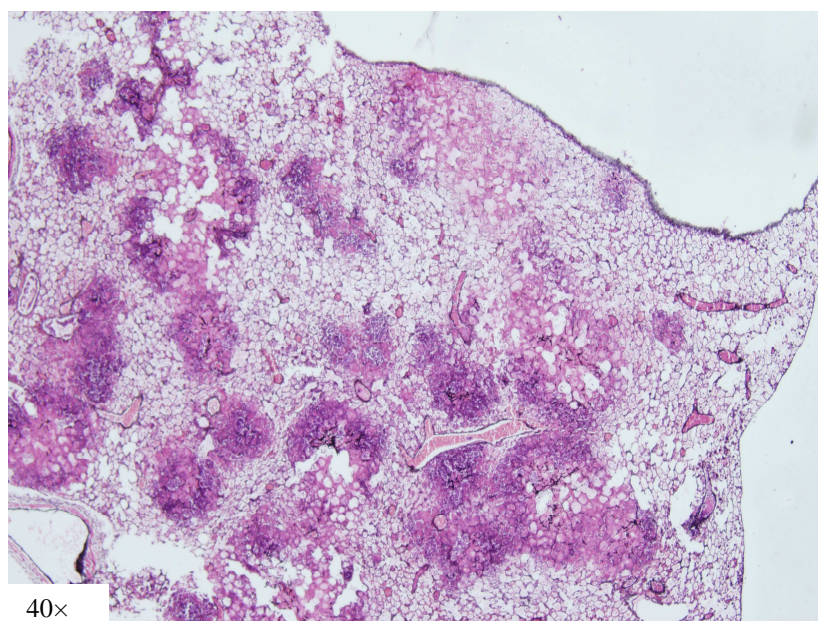
En resumen, el análisis de la supervivencia de ratones infectados con cepas mutantes *zrfCΔ* de *A. fumigatus* reveló que este gen era necesario para la obtención de zinc a partir del tejido vivo y, por consiguiente, para la virulencia del hongo. Además, al contrario de lo que sugería el crecimiento en suero bovino, el extremo amino de ZrfC es la parte de la proteína que le confiere específicamente la capacidad de adquirir zinc a partir de los tejidos vivos.

Los estudios de supervivencia se completaron con el análisis histopatológico de muestras de pulmones de ratones infectados con cada una de las cepas. Para ello, se

seleccionó al azar un ratón de cada grupo de infección que hubiera muerto en el transcurso de la curva de supervivencia, así como de un ratón sacrificado a los 14 días del grupo de ratones infectado con 10^4 conidios de la cepa AF721, ya que en este ensayo no había muerto ningún ratón. Los pulmones se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina y se tiñeron de acuerdo al método de tinción con metenamina-nitrato de plata de Gomori modificado por (Grocott, 1955) (método GMS) seguido de una contra-tinción con hematoxilina y eosina (H & E) (Ford and Friedman, 1967) (Huppert *et al.*, 1978) (GMS-HE) según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Este método de tinción permite observar el hongo creciendo en el tejido pulmonar y simultáneamente apreciar las lesiones titulares asociadas al crecimiento fúngico (Schwarz, 1982). El estudio de los cortes histológicos mostraba que los pulmones de los ratones que habían sido infectados con la cepa silvestre o con cepas con el mismo grado de virulencia, como AF48 y AF731, presentaban numerosos focos de crecimiento fúngico (Fig. 15R). En coherencia con los datos de carga fúngica, se pudo apreciar un menor número de focos en los pulmones de ratones inoculados con 10^4 esporas (en torno a 20 focos por sección) que en los ratones inoculados con 10^5 esporas (todos ellos con más de 125 focos por sección). Los focos de infección observados parecen haberse generado a partir de esporas que han germinado sobre el epitelio que tapiza los bronquiolos, sacos alveolares o alveolos formando hifas que se extienden y ramifican penetrando e invadiendo el tejido pulmonar (Fig. 16R). Con frecuencia se observa que las hifas atraviesan el endotelio de vasos sanguíneos pulmonares (angioinvasión) causando trombosis y/o hemorragias (Fig. 17Ra) y en muchos casos se aprecia que los espacios alveolares se encuentran repletos de sangre (hemorragias intra-alveolares) (Fig. 17Rb). En ningún caso se observó infiltración de PMN como corresponde a ratones neutropénicos. Los pulmones de los ratones infectados con las cepas que habían mostrado reducción significativa de la virulencia como AF541 y AF791, presentaban focos de crecimiento fúngico muy reducidos en número y grado de invasión del tejido (Fig. 18R). Además, no se apreciaron diferencias significativas en el número de focos entre los pulmones de animales inoculados con 10^4 y 10^5 esporas y en todos los casos era relativamente baja (en ningún caso se superaban los 20 focos por sección). Los focos de infección se caracterizan por presentar edema y acumulación de una sustancia fibrosa, probablemente fibrina, dentro de los espacios alveolares. Además, a pesar del menor grado de invasión tisular, las lesiones tienen un aspecto esponjoso posiblemente debido a la necrosis del tejido (Fig. 19R). Como en los casos previos, tampoco se observa infiltración de PMNs, aunque resultaba relativamente fácil observar la presencia de macrófagos alveolares en partes sanas del tejido y que en general no parecen estar respondiendo activamente a la infección (Fig. 20Ra). Finalmente, en los pulmones de animales infectados con 10^5 conidios de la cepa AF721 se observan áreas claramente delimitadas en las que se encuentra un material que aparece teñido con GMS y que probablemente corresponda a restos fúngicos sin distinguirse la típica estructura micelial, ya que la tinción de Gomori-Grocott tiñe también elementos fúngicos no viables (Fig. 21R). Una posibilidad es que este material proceda de la lisis de las hifas por acción de células residuales del

sistema inmune del ratón. De hecho, ocasionalmente se pudo observar conidios germinado dentro de macrófagos (Fig. 20Rb). Por último, en el pulmón inoculado con 10^4 conidios de la cepa AF721, como era esperable, no se encontró rastro del hongo.

a)



b)

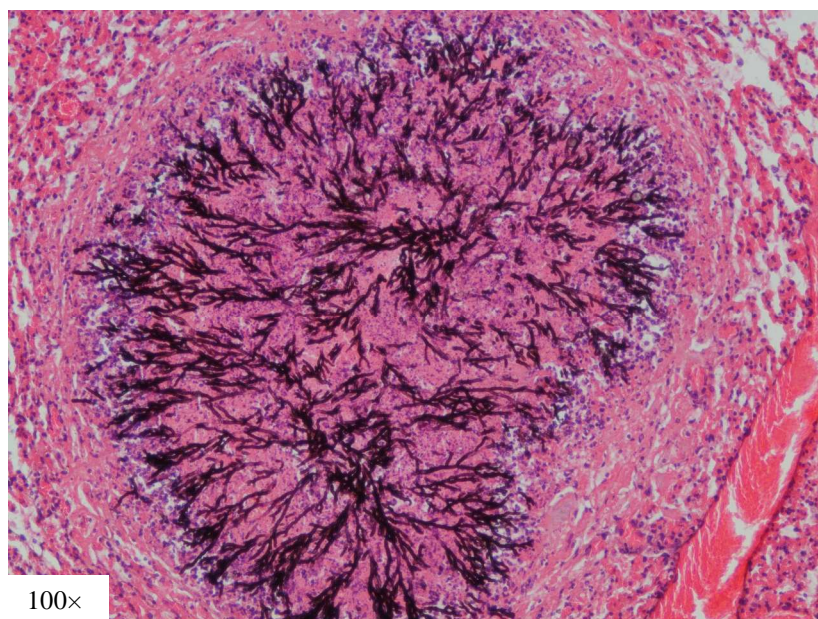
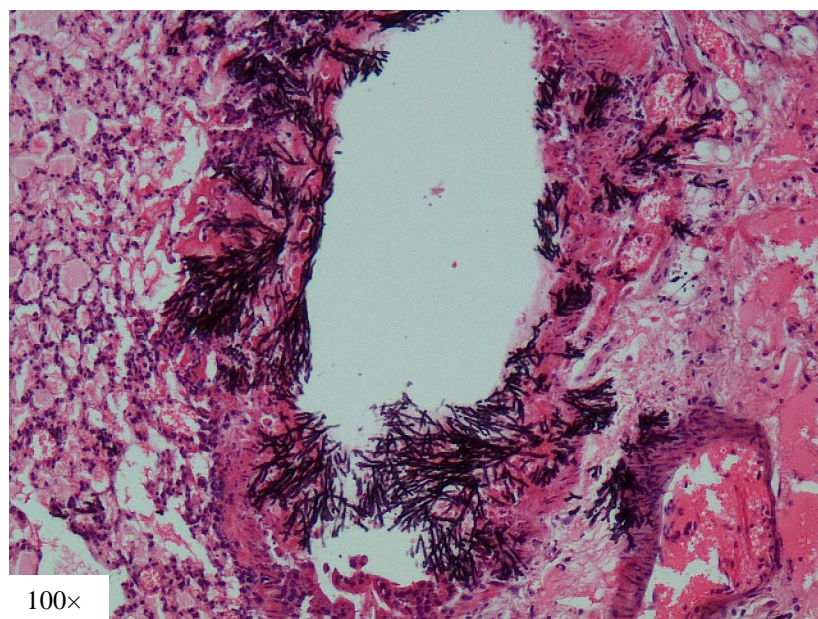


Fig. 15R: Histología de pulmones de ratones inmunosuprimidos infectados con cepas que mostraban virulencia silvestre. **a)** Pulmón de un ratón infectado con la cepa AF48. Se puede observar el altísimo número de focos fúngicos presentes. **b)** Pulmón de un ratón infectado con la cepa silvestre (AF14). Se aprecia la gran invasión del tejido característica de las cepas con virulencia silvestre.

a)



b)

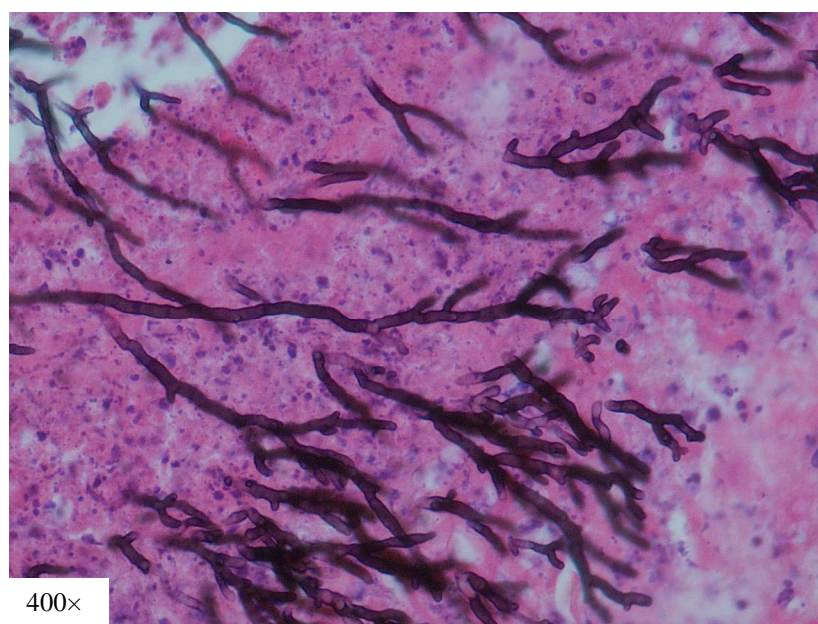
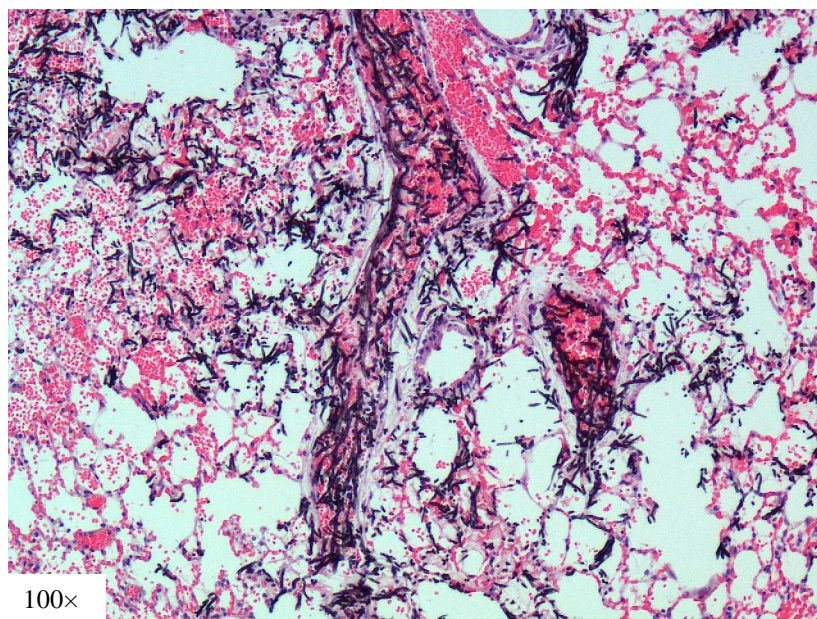


Fig. 16R: Histología de pulmones de ratones inmunosuprimidos infectados con cepas que mostraban virulencia silvestre. **a)** Pulmón de un ratón infectado con la cepa AF731, se aprecia cómo los conidios han germinado en el epitelio del bronquiolo y las hifas que forman penetran e invaden el tejido pulmonar. **b)** Detalle de las hifas de la cepa silvestre invadiendo el tejido pulmonar.

a)



b)

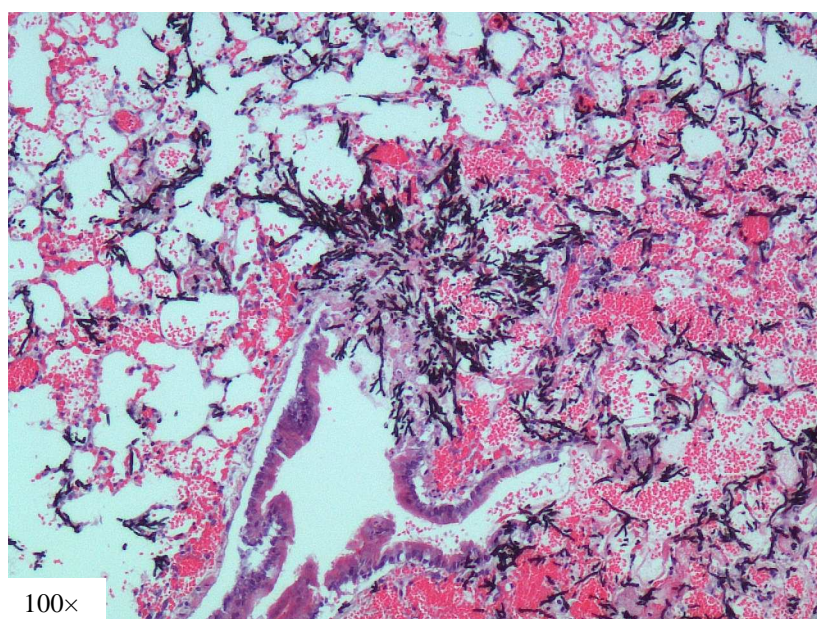
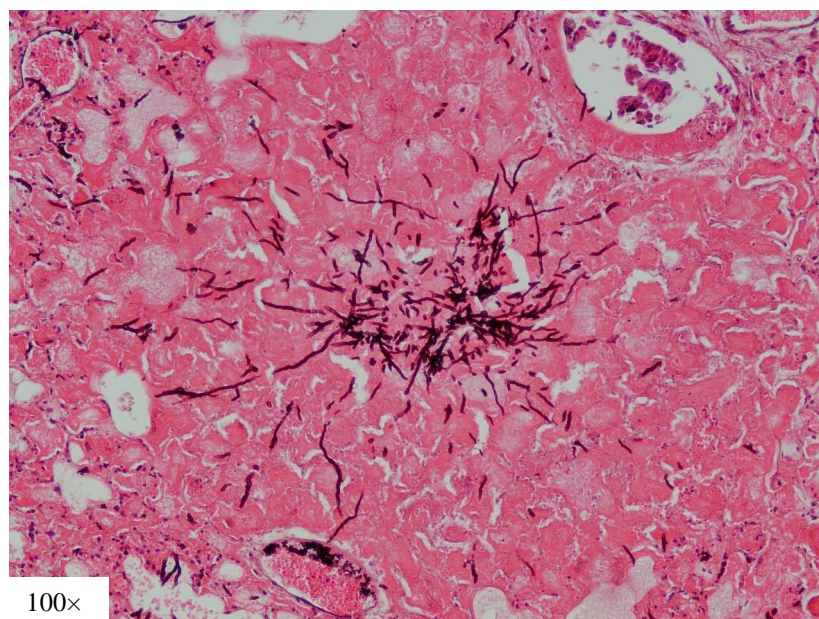


Fig. 17R: Histología de pulmones de ratones inmunosuprimidos infectados con cepas que mostraban virulencia silvestre. **a)** Se puede advertir cómo las hifas han atravesado el endotelio del vaso sanguíneo y crecen en el interior alveolar. En **a)** y **b)** se aprecian numerosas hemorragias intra-alveolares.

a)



b)

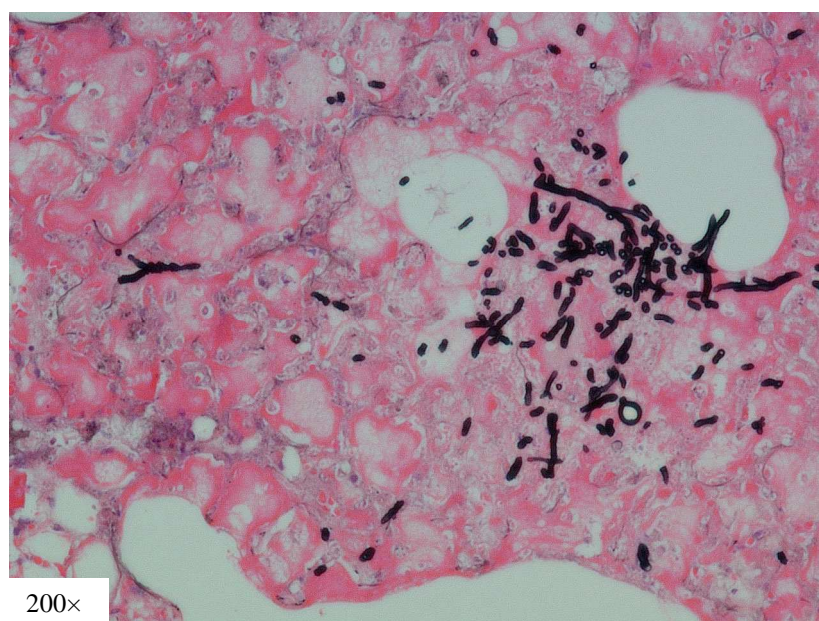
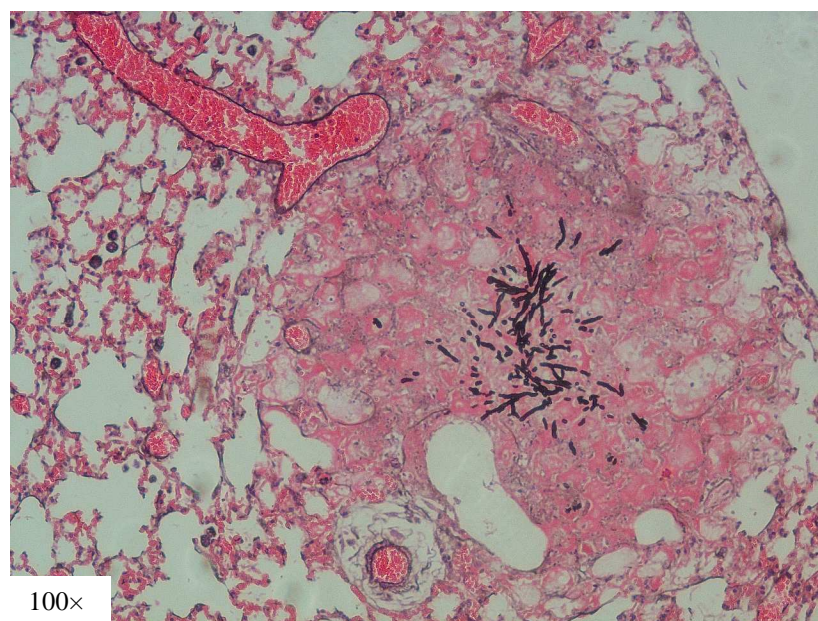


Fig. 18R: Histología de pulmones de ratones inmunosuprimidos infectados con cepas que mostraban virulencia reducida. **a)** Pulmón de un ratón infectado con la cepa AF541, se observa el menor grado de invasión tisular que este mutante es capaz de realizar. **b)** Pulmón de un ratón infectado con la cepa AF791, se percibe la menor capacidad de crecimiento del hongo que presenta esta cepa.

a)



b)

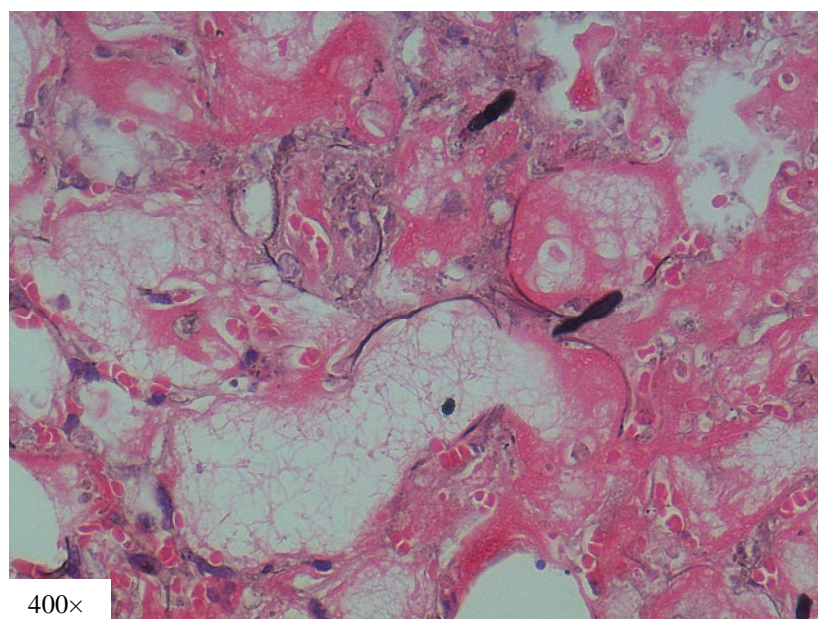
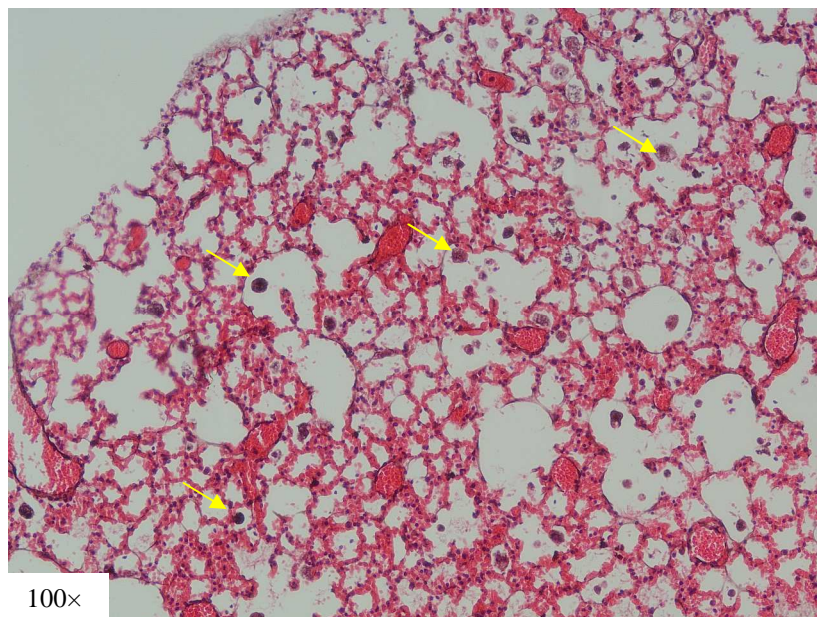


Fig. 19R: Histología de pulmones de ratones inmunosuprimidos infectados con cepas que mostraban virulencia reducida. **a)** Pulmón de un ratón infectado con la cepa AF791 en el que se observa el característico aspecto esponjoso que presentan los focos de infección, probablemente debido a la necrosis del tejido. **b)** Detalle de un foco de crecimiento fúngico de la cepa AF791 en el que se aprecia la acumulación de una sustancia fibrosa en el interior de los espacios alveolares.

a)



b)

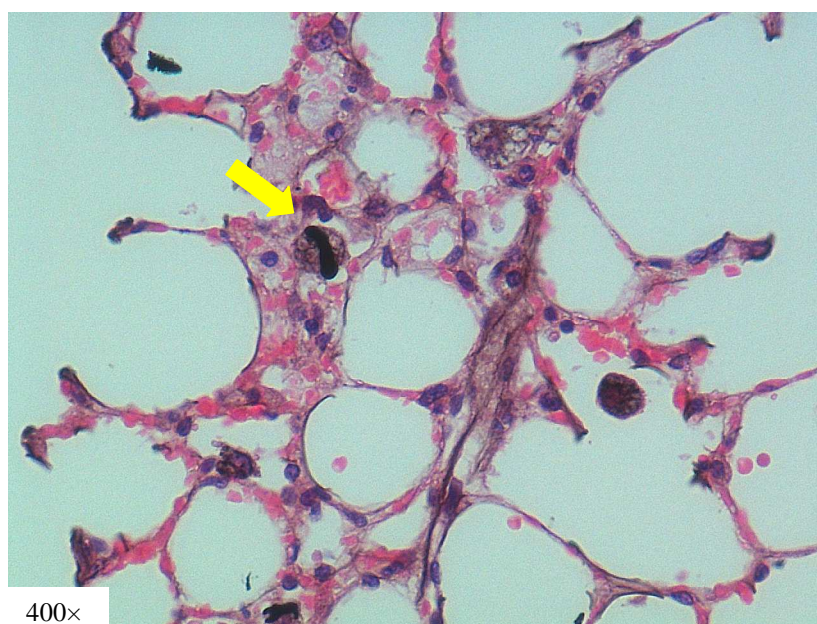


Fig. 20R: Histología de pulmones de ratones inmunosuprimidos infectados con cepas que mostraban virulencia reducida. **a)** Región sana del pulmón de un ratón infectado con la cepa AF541 en el que se localizan un gran número de macrófagos alveolares (se han marcado algunos con flechas amarillas para facilitar su identificación). **b)** Detalle de un conidio germinando en el interior de un macrófago.

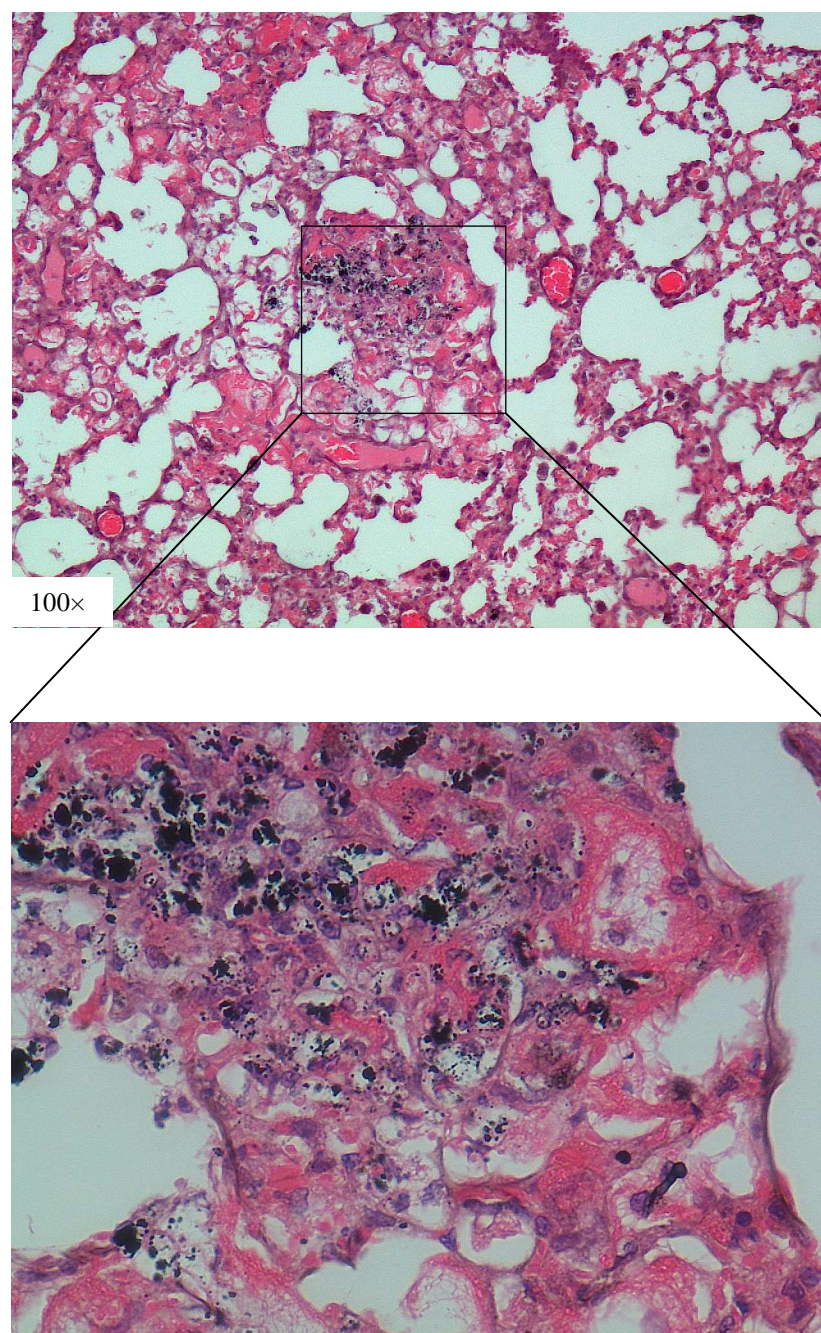


Fig. 21R: Histología de pulmón de un ratón inmunosuprimido infectado con la cepa triple mutante en el que se aprecia una región teñida con GMS y que probablemente corresponda a restos fúngicos sin distinguirse la típica estructura micelial.

La gravedad de la infección que *Aspergillus* causa en ratones varía dependiendo del régimen de inmunosupresión al que hayan sido sometidos (Balloy *et al.*, 2005; Spikes *et al.*, 2008). Así, la inmunosupresión con ciclofosfamida produce una disminución de las células de la serie blanca, entre las que se incluyen los neutrófilos, provocando neutropenia. Por otra parte, la inmunosupresión con corticoesteroides afecta a la funcionalidad de los fagocitos, de manera que pierden la capacidad de matar los conidios e hifas de *A. fumigatus* al inhibir la formación de ROS. Por consiguiente, para investigar si la función de ZrfC estaba influenciada por el régimen de inmunosupresión, se analizó la supervivencia de ratones inmunosuprimidos únicamente con acetato de hidrocortisona e infectados con 2×10^6 conidios de las cepas *zrfCΔ* (AF541), *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* (AF721) en comparación con la supervivencia de los ratones infectados con las cepas silvestre (AF14) y reconstituida *zrfAΔzrfBΔzrfC⁺* (AF731) (Fig. 22R)

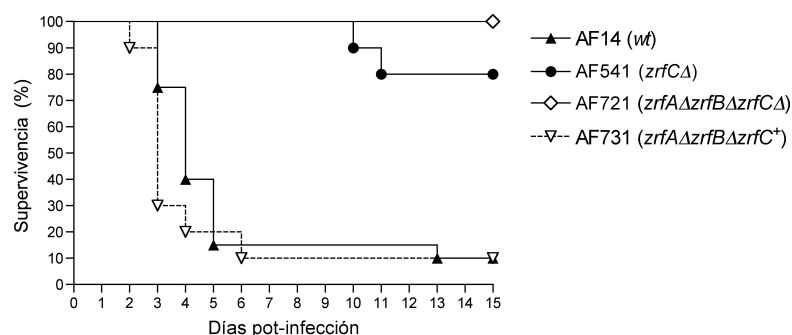
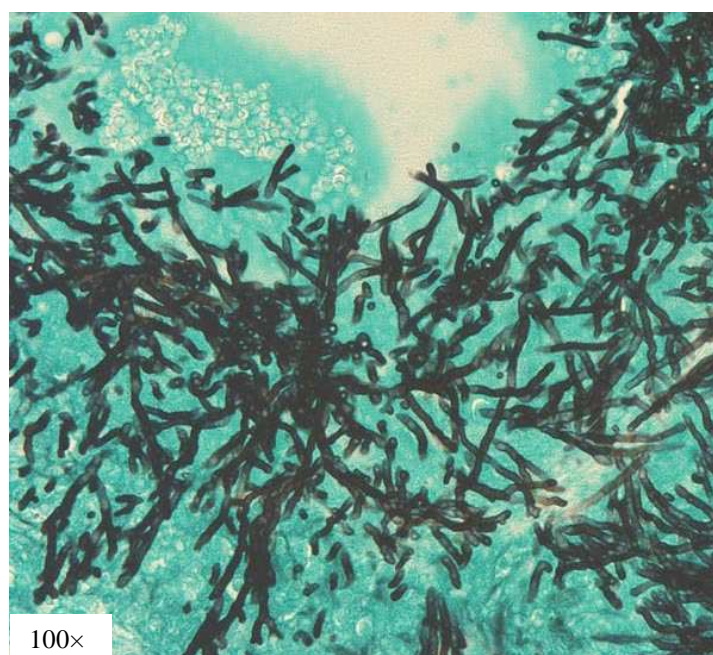


Fig. 22R: Curva de supervivencia de los ratones inmunosuprimidos únicamente con acetato de hidrocortisona e infectados con 2×10^6 conidios de las cepas AF14, AF541, AF721 y AF731.

El patrón obtenido estaba en perfecta concordancia con los resultados anteriores en los que se había administrado conjuntamente ciclofosfamida y cortisona. Los ratones infectados con las cepas silvestre AF14 y revertiente AF731 no mostraban diferencia en sus curvas de supervivencia ($P = 0,208$). Sin embargo, los ratones infectados con la cepa AF541 mostraba una reducción significativa en su virulencia con respecto a la cepa silvestre ($P = 0,0002$) y la cepa AF721 era totalmente avirulenta ($P < 0,0001$) con este régimen de inmunosupresión. El examen de secciones de pulmones de estos ratones (Fig. 23R) revelaba que en el fondo genético *zrfAΔzrfBΔ*, la expresión de *zrfC* permitía el crecimiento y elongación de las hifas, mientras que los conidios del mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* no formaban hifas, aunque la mayoría eran capaces de germinar.

a)



b)

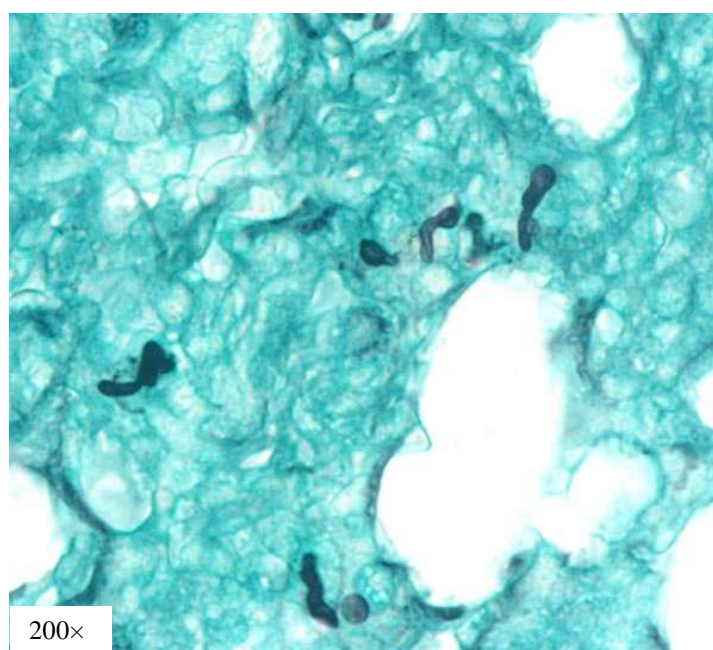


Fig. 23R: Pulmones de ratones inmunosuprimidos únicamente con acetato de hidrocortisona e infectados con 2×10^6 conidios de la cepa **a)** revertiente de *zrfC* (AF731) o **b)** mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*. Las secciones se tiñeron exclusivamente con GMS.

5. Importancia de *aspf2* en la virulencia de *A. fumigatus*

El gen *aspf2* es necesario para el crecimiento óptimo de *A. fumigatus* en medio definido alcalino extremadamente limitante en zinc, aunque es irrelevante para el crecimiento en suero bovino, por lo que es posible que sea dispensable para la virulencia del hongo. Para investigar si el gen *aspf2* era necesario para la virulencia de *A. fumigatus* se realizó un experimento preliminar infectando 5 ratones con 10^4 conidios de una cepa *aspf2* Δ (AF871) y otros tantos con una cepa revertiente *aspf2*⁺ (AF881) (Fig. 24R).

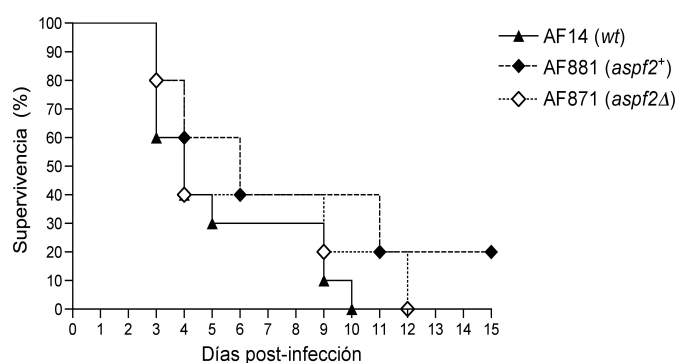


Fig. 24R. Curva de supervivencia de los ratones infectados con 10^4 conidios/ratón de las cepas AF14 y AF871 y AF881. La curva de la cepa silvestre representa la supervivencia de un grupo de 10 ratones, mientras que las curvas de las cepas AF871 y AF881 representan cada una la supervivencia de un grupo de 5 ratones.

En la figura se representan las curvas de supervivencia de los ratones infectados con las cepas AF871 y AF881 superpuestas con la curva previamente realizada de los ratones infectados con el mismo inóculo de la cepa silvestre. Como puede observarse, los ratones infectados con la cepa *aspf2* Δ no mostraban diferencia significativa en su curva de supervivencia con respecto a la cepa silvestre ($P = 0,388$) o revertiente *aspf2*⁺ ($P = 0,582$), lo que sugiere que el gen *aspf2* no es necesario para la virulencia del hongo. No obstante, como se ha mencionado éste es tan sólo un experimento preliminar que no permite extraer conclusiones definitivas sobre la función de *Aspf2* en virulencia.



DISCUSIÓN

El zinc es un oligoelemento esencial para todos los organismos, puesto que es necesario para la estabilidad estructural y/o función catalítica de más de 300 metaloenzimas (Kaim and Schwederski, 1994). Sin embargo, la homeostasis celular de zinc debe estar finamente regulada ya que tanto su déficit como su exceso puede resultar perjudicial para las células (Gaither and Eide, 2001). El organismo en el que mejor se conoce la homeostasis del zinc es la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. En esta levadura la homeostasis del zinc está regulada por el factor Zap1 (Zhao *et al.*, 1998). En medios limitantes en zinc este factor induce la expresión de los genes que codifican los transportadores de la familia ZIP Zrt1 y Zrt2 localizados en la membrana plasmática así como del transportador Zrt3 localizado en la membrana vacuolar (Zhao and Eide, 1996a, Zhao and Eide, 1996b). Sin embargo, *S. cerevisiae* está adaptada a vivir en ambientes ácidos, por lo que en medios neutros o ligeramente alcalinos crece muy lentamente, mientras que en ambientes más básicos (pH > 8) ya no puede crecer. Posiblemente por esta razón *S. cerevisiae* no presenta un sistema de adquisición de zinc específico para esas condiciones, aunque también se podría argumentar que la incapacidad de *S. cerevisiae* para crecer en medios alcalinos fuera en parte consecuencia de la falta de un sistema de adquisición de zinc en estas condiciones según puede deducirse de los experimentos de complementación realizados expresando *zrfC* en una cepa *zrt1Δzrt2Δ* de *S. cerevisiae* (figura 3 en artículo 2). En cualquier caso, gracias a los conocimientos adquiridos sobre la homeostasis del zinc en *S. cerevisiae*, se ha comenzado a estudiar la homeostasis del zinc en otros hongos filamentosos como *A. fumigatus* (Vicente-franqueira *et al.*, 2005) y *Neurospora crassa* (Kiranmayi *et al.*, 2009) o levaduras como *Candida albicans* (Kim *et al.*, 2008) y *Schizosaccharomyces pombe* (Boch *et al.*, 2008, Dainty *et al.*, 2008). Sin embargo, todos estos estudios comenzaron con la búsqueda de las proteínas ortólogas de los transportadores Zrt1 y Zrt2 de *S. cerevisiae*, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, por lo que consecuentemente en la mayoría de los casos se han estudiado solamente los transportadores ZIP encargados de la adquisición del metal a partir de medios ácidos, que además es el pH de la mayoría de los medios de cultivo que se utilizan rutinariamente para el crecimiento de hongos. Sin embargo, a diferencia de los microorganismos no patógenos, los hongos patógenos humanos como *C. albicans* y *A. fumigatus* deben ser capaces de adquirir eficazmente a partir de los tejidos el zinc que necesitan para crecer dentro de un hospedador susceptible. Por tanto, la homeostasis del zinc en los hongos patógenos es necesariamente más compleja que en *S. cerevisiae* ya que han de poseer un sistema específico de adquisición de zinc a partir de medios alcalinos extremadamente limitantes en este catión esencial que les permita sobrevivir y proliferar en los tejidos vivos.

1. El sistema alcalino de adquisición de zinc

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelaron que la expresión de los genes *zrfA* y *zrfB* está en gran parte reprimida a pH alcalino y que eran dispensables para el crecimiento de *A. fumigatus* en medios alcalinos limitantes en zinc (Vicentefranqueira *et al.*, 2005). Además, también se demostró que la regulación de la homeostasis del zinc era esencial para la virulencia del hongo, ya que un mutante sin el gen codificante del regulador transcripcional ZafA es avirulento en un modelo murino de aspergilosis invasiva (Moreno *et al.*, 2007b). Por tanto, si los transportadores ZrfA y ZrfB son dispensables para crecer en medios alcalinos limitantes en zinc siendo ZafA esencial, quiere decir que *A. fumigatus* debe poseer al menos un gen cuya expresión se induce por ZafA que codifica un transportador ZIP de membrana plasmática encargado de la adquisición de zinc a partir de medios alcalinos limitantes en este catión y que debe ser importante en la virulencia del hongo. El análisis de la expresión de todos los genes de *A. fumigatus* que presumiblemente codifican proteínas pertenecientes a la familia ZIP (Calera and Hass, 2009), reveló que el único de ellos inducido por ZafA en medios alcalinos limitantes en zinc era el gen *zrfC*, por lo que se estudió la función de este gen en la homeostasis del zinc en medios alcalinos, llegándose así a corroborar la hipótesis inicial (artículo 2). Efectivamente, *A. fumigatus* posee un sistema de adquisición de zinc codificado por el gen *zrfC* que opera en medios alcalinos extremadamente limitantes en zinc y en el que posiblemente también participan otras proteínas como AspF2 y/o la proteína GzbA, una proteína GPI que presenta varios motivos putativos de unión de zinc similares a los que presenta AspF2. Además, uno de los principales hallazgos realizados durante estos estudios fue la demostración de que la expresión de *zrfC* y *aspf2* a pH ácido estaba reprimida por el factor PacC, principal encargado de la regulación de la expresión génica según el pH del medio en *Aspergillus* (Peñalva and Arst, 2004). Este mecanismo es insólito y según nuestro conocimiento es la primera vez que se describen genes que presentan este tipo de regulación por PacC. Aunque desde hace tiempo se sospecha que PacC podría realizar alguna función en la regulación génica a pH ácido (Peñalva and Arst, 2004), hasta ahora nunca se ha podido comprobar cuál era ésta ya que no se tenía constancia de ningún gen que pudiera estar sujeto a la acción de PacC en medio ácido. Por tanto, la regulación de la expresión de *zrfC*-*aspf2* proporciona un modelo ideal para desentrañar esta esquivada función del factor PacC. Una posibilidad para explicar este fenómeno es que la pequeña cantidad de PacC⁷² (en su conformación abierta) y/o PacC⁵³ que se forman a pH ácido, sea capaz de entrar en el núcleo antes de ser procesados por el proteasoma y unirse a los sitios PR del promotor de *zrfC*-*aspf2* reprimiendo la actividad transactivadora de ZafA. De hecho, PacC⁵³ es la forma análoga a la configuración activa del regulador de pH de *S. cerevisiae* Rim101, que produce represión de la expresión de diversos genes (Li and Mitchell, 1997; Lamb *et al.*, 2001). Además, probablemente sea determinante el número y disposición relativa de los sitios de unión de PacC (PR) respecto a los sitios ZR en los promotores de los genes en los que realiza esta función represora. En este sentido, se ha observado un elevado número de

sitios PR en el promotor de *zrfC-aspf2*, de manera que aunque hubiera muy poca cantidad de PacC⁵³ o PacC⁷² abierta en el núcleo cualquiera de estas formas sería capaz de unirse al promotor de *zrfC-aspf2* con mayor probabilidad que a la mayoría de los promotores de los genes regulados por PacC²⁷ a pH alcalino. Además, la proximidad física existente entre los sitios PR y ZR en el promotor de *zrfC-aspf2* posibilitaría la interacción física entre PacC y ZafA a nivel del ADN. Finalmente, teniendo en cuenta que el factor ZafA por sí solo es capaz de activar la transcripción de *aspf2* y *zrfC* independientemente de PacC (hecho que se demostró inactivando los sitios PR del promotor), es posible que sean necesarias al menos dos moléculas de PacC para interaccionar con ZafA y reprimir la transcripción a pH ácido. Sea como sea, lo relevante de este descubrimiento es que por primera vez se obtienen pruebas sólidas que indican que la función de PacC a pH alcalino no es necesariamente la de inducir la transcripción de genes que se expresan a pH alcalino, si es que realmente es ésta la función de PacC actuando en solitario, sino la de modular, en función del pH ambiental, la actividad de otros factores transcripcionales que son los que realmente tienen la capacidad para inducir la expresión génica.

2. La capacidad de obtener zinc en la virulencia de *A. fumigatus*

Aspergillus fumigatus presenta varias características biológicas que le permiten crecer dentro de los tejidos vivos y causar enfermedad (Tekaiia and Latgé, 2005; Hohl and Feldmesser, 2007). Entre ellas, es especialmente relevante su capacidad para obtener todos los nutrientes que precisa a partir de los tejidos del hospedador, incluyendo los micronutrientes esenciales como el hierro y el zinc (Calera and Hass, 2009). En este sentido, se ha demostrado que la capacidad de obtener hierro mediante un mecanismo que implica la participación de sideróforos es esencial para la virulencia de *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004). De la misma manera, la correcta regulación de la homeostasis del zinc mediada por el activador transcripcional ZafA también es esencial para la virulencia de *A. fumigatus* (Moreno *et al.*, 2007b). Sin embargo, la delección de *zafA* necesariamente afecta a la expresión de un gran número de genes, por lo que la incapacidad de una cepa *zafAΔ* para crecer en tejidos vivos podría no ser exclusivamente debida a la deficiencia de zinc, sino también a la desregulación de otros procesos celulares para los que el zinc es un cofactor esencial. En este sentido, resulta evidente que el aspecto fundamental que en primera instancia influye en el correcto mantenimiento de la homeostasis del zinc es la reducción o supresión completa de la capacidad de obtener zinc a partir de un medio tan limitante en zinc como son los tejidos vivos.

Hasta ahora, todos los estudios realizados para investigar la homeostasis del zinc en *A. fumigatus* se han realizado sobre medios sólidos sintéticos de composición definida (Moreno *et al.*, 2007b). Por tanto, para completar la caracterización fenotípica de cepas mutantes en los transportadores de zinc de membrana plasmática regulados por ZafA (*zrfA*, *zrfB* y *zrfC*) antes de proceder al análisis de su capacidad patogénica en un modelo murino de API, se analizó la capacidad de crecimiento de mutantes *zrfCΔ*, *zrfAΔzrfBΔ* y

zrfAΔzrfBΔzrfCΔ en medios preparados con varias concentraciones (10%, 40% y 70%) de suero bovino tanto de origen fetal (FBS) como procedente de individuos adultos (BS). El suero tiene pH alcalino, el cual se mantiene constante durante el tiempo de cultivo y, además, contiene gran cantidad de proteínas que secuestran los metales con alta afinidad (Gifford *et al.*, 2002). Debido a estas características, *a priori* los medios preparados con suero proporcionan un ambiente similar al que las esporas encuentran cuando entran en contacto con los tejidos de un individuo inmunosuprimido susceptible en lo que al pH ambiental, concentración de metales y biodisponibilidad de los mismos se refiere. El FBS contiene aproximadamente el doble de glucosa y una cantidad de anticuerpos mucho menor que el BS (que procede de bovinos de 1-2 años), mientras que la concentración de glucosa en el BS es aproximadamente la mitad que en el suero humano (Kennedy and Millikan, 1938). Por tanto, para minimizar el posible efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento fúngico, tanto el BS como el FBS se suplementaron con 0,1% glucosa (concentración normal de glucosa en el suero humano). Por otra parte, ambos tipos de suero tienen una concentración total de cationes metálicos ([Zn] = 0,61 mg/L; [Fe] = 0,67 mg/L; [Cu] = 0,67 mg/L) (Yokus and Cakir, 2006) similar a la especie humana ([Zn] = 0,94 mg/L; [Fe] = 1,08 mg/L; [Cu] = 1,17 mg/L) (Iyengar and Woittiez, 1988). Finalmente, el uso de medios sólidos nos permitió imitar el crecimiento del hongo en un sustrato semisólido como son los tejidos vivos. Los resultados obtenidos demostraron que, en consonancia con lo descrito por otros autores, altas concentraciones de suero inhiben el crecimiento microbiano (Gifford *et al.*, 2002). Posiblemente la inhibición esté causada por la carencia de metales libres presentes en el medio. En este sentido, una de las razones por las cuales el suero y otros fluidos corporales inhiben el crecimiento microbiano es porque éste se encuentra impedido por proteínas que unen hierro con alta afinidad como la transferrina y lactoferrina (Bullen *et al.*, 2006). Sin embargo, *A. fumigatus* ha desarrollado la capacidad para obtener hierro a partir de la transferrina presente en el suero (Hissen *et al.*, 2004). Además, el suplemento del BS al 40% con hierro tan sólo mejora levemente y por igual la capacidad de crecimiento de todas las cepas (a excepción de la cepa *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*). Por tanto, la inhibición del crecimiento de *A. fumigatus* en suero no se puede atribuir únicamente a la baja disponibilidad de hierro en suero. Por otra parte, el suplemento del suero con zinc mejora la capacidad de crecimiento de la cepa *zrfCΔ* pero sorprendentemente reduce la capacidad de crecimiento de las cepas *zrfC⁺* (*wt* y *zrfAΔzrfBΔzrfC⁺*), respecto a la capacidad de crecimiento que éstas presentan en suero sin suplementos. No obstante, cuando el suero suplementado con 100 μM zinc se suplementaba adicionalmente con cobre y hierro (100 μM cada uno) se restablece y mejora por igual la capacidad de crecimiento de todas las cepas (a excepción de la cepa *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*) respecto a la capacidad de crecimiento que éstas presentan en suero sin suplementos. Una posible explicación para este fenómeno es que a pesar de que el suero es un medio muy limitante en zinc libre, la proteína ZrfC es capaz de secuestrar eficientemente el zinc del suero, permitiendo el crecimiento de las cepas *zrfC⁺* pero no el de las cepas *zrfC⁻*. Sin embargo, al suplementar el suero con zinc puede reprimirse la expresión de *zrfC* en las

cepas *zrfC*⁺, a la vez que el exceso de zinc puede resultar nocivo para el hongo en condiciones que limitan la disponibilidad de hierro (y cobre) como es en presencia de suero, lo cual estaría en consonancia con lo descrito por otros investigadores en el sentido de que el zinc resulta tóxico en medios limitantes en hierro (Yasmin *et al.*, 2009). Este fenómeno es más evidente cuando el suero se suplementa con una alta concentración de zinc (1 mM) mientras que cuando el suero suplementado con 1 mM zinc se suplementa adicionalmente con cobre y hierro (100 μ M cada uno) todas las cepas recuperan su capacidad de crecimiento, incluyendo la cepa *zrfA* Δ *zrfB* Δ *zrfC* Δ que crece igual que la silvestre. Más aún, la hipótesis de que el exceso de zinc resulta tóxico en ausencia de hierro y cobre se ve reforzada por el hecho de que ninguna cepa es capaz de crecer en presencia de 70% de suero suplementado con una alta concentración de zinc (1 mM), incluso en presencia de un suplemento de hierro y cobre. Por otra parte, durante estos estudios se descubrió que los transportadores de zinc también podrían desempeñar alguna función en la homeostasis del cobre. Como en el caso del hierro, un exceso de zinc también podría resultar nocivo en medios limitantes en cobre ya que el suplemento del suero (limitante en zinc) con cobre incrementa la expresión de los genes *zrfB*, *zrfC* y *aspf2* así como la capacidad de crecimiento de todas las cepas (excepto la mutante *zrfA* Δ *zrfB* Δ *zrfC* Δ). Precisamente, si como es lógico el incremento de la expresión de los transportadores en presencia de cobre se traduce en una mayor capacidad de adquisición de zinc a partir de suero se podría explicar la leve mejora de la capacidad de crecimiento de las cepas *zrfC* Δ y *zrfA* Δ *zrfB* Δ *zrfC*⁺ (pero no de la cepa *zrfA* Δ *zrfB* Δ *zrfC* Δ) en suero suplementado con cobre con respecto al crecimiento observado en suero sin suplementos. Por tanto, todas estas observaciones no sólo confirman la existencia de una regulación cruzada entre la homeostasis del zinc y del hierro sino que también sugieren la existencia de una regulación cruzada entre la homeostasis del zinc y del cobre, en el sentido de que un exceso de cobre potencia la adquisición de zinc posiblemente en un intento de la célula para neutralizar el efecto tóxico del exceso de cobre. Finalmente, como es esperable también debe existir interrelación entre la homeostasis del hierro y del cobre ya que la capacidad de crecimiento del hongo es mayor en el suero suplementado con hierro y cobre que en el suero suplementado sólo con hierro o sólo con cobre.

La regulación cruzada entre la homeostasis de estos tres elementos es un aspecto que ha sido bien estudiado en la levadura *S. cerevisiae* (revisado en Rutherford and Bird, 2004) mientras que este aspecto de la fisiología de *A. fumigatus* es aún muy desconocido hasta el punto de que ni siquiera hay estudio alguno sobre la homeostasis del cobre. En cualquier caso, la existencia de regulación cruzada entre la homeostasis del hierro, zinc y cobre en *A. fumigatus* sugiere que la regulación de la expresión de algunos genes que codifican proteínas directamente implicadas en la homeostasis del Fe o que forman parte de ciertas rutas metabólicas dependientes de hierro debe estar controlada en alguna medida por ZafA (regulador de la homeostasis del zinc) (Moreno *et al.*, 2007b), a la vez que la expresión de algunos genes que codifican proteínas directamente implicadas en la homeostasis del Zn o que forman parte de ciertas rutas metabólicas dependientes de zinc debe estar influida por

factores implicados en la regulación de la homeostasis del hierro (ej. SreA y HapX). SreA es un factor tipo GATA que se expresa en medios repletos de hierro y reprime la expresión de genes implicados en la biosíntesis e incorporación de sideróforos para la obtención de hierro cuando la concentración de este metal en el medio no es limitante (Schrettl *et al.*, 2008). Por su parte, HpaX es un factor que se expresa en medios limitantes en hierro e interacciona con el complejo de unión a la secuencia CCAAT (CBC) para reprimir la expresión de genes que codifican proteínas que participan en rutas dependientes de hierro en medios limitantes en hierro (ej. *cycA*, *acoA*, *lysF* y *hemA*) (Hortschansky *et al.*, 2007). Además, SreA y HapX reprimen parcialmente la expresión de *hapX* y *sreA*, respectivamente (Hortschansky *et al.*, 2007). Curiosamente, en las regiones promotoras de los genes *sreA* y *hapX* también existe una secuencia muy similar al motivo ZR por lo que tal vez ZafA sea capaz de unirse a ellas influenciando la expresión de estos genes. Además, los genes *freA* (metalorreductasa de membrana del sistema de asimilación reductiva del hierro) y *fetD* (transportador de hierro de baja afinidad) de *A. fumigatus* también tienen secuencias similares al motivo ZR en sus promotores y posiblemente están reguladas por zinc de la misma manera que el factor Zap1 de *S. cerevisiae* regula la expresión de *FET4* (Waters and Eide, 2002). Además, el análisis del transcriptoma de *A. fumigatus* cultivado en presencia de un exceso de hierro se ha comprobado que se incrementa el nivel de expresión de algunos genes relacionados con la homeostasis del zinc (ej. *zafA*, *zrfB* y *zrfD*) (Schrettl *et al.*, 2008). Por otra parte, la regulación cruzada entre la homeostasis del zinc y del cobre requeriría que la regulación de la expresión de algunos genes relacionados con la homeostasis del cobre estuviera controlada por ZafA a la vez que la expresión de ciertos genes implicados en la homeostasis del Zn debería estar influida por factores de transcripción implicados en la regulación de la homeostasis del cobre. Actualmente, no hay estudios sobre la homeostasis del cobre en *A. fumigatus*. Sin embargo, la homeostasis del cobre ha sido muy bien estudiada en *S. cerevisiae*. En comparación con el alto número de proteínas que necesitan Fe o Zn para su actividad enzimática o estabilidad estructural, existen aproximadamente una docena de proteínas en la célula que necesiten el cobre como cofactor (Prohaska and Gybina, 2004). Sin embargo, a pesar de ello la homeostasis del cobre está estrictamente regulada por la acción recíproca del factor Ace1 (en medios repletos de cobre) y del factor Mac1 (en medios limitantes de cobre) (Keller *et al.*, 2005). En particular, el factor Ace1 induce la expresión de tres genes de *S. cerevisiae* en medios con alta concentración de cobre: *CUP1* y *CRS5* (codifican metalotioneínas que previenen los efectos nocivos de un exceso de cobre) y *SOD1* (codifica una Cu/Zn-superóxido dismutasa) (Rutherford and Bird, 2004). Así pues, podría ser que en la regulación cruzada entre la homeostasis del zinc y del cobre estuviera implicado un factor de *A. fumigatus* similar al factor Ace1 de *S. cerevisiae* (el gen ortólogo de Ace1 en *A. fumigatus* posiblemente se corresponde con el gen AFUA_3G08010) que influyera en la expresión de los genes *zrfB* y *zrfC* en presencia de cobre. Sin embargo, considerando que los tejidos vivos deben ser medios limitantes en cobre de la misma manera que los son en zinc y hierro, la función del factor AceA no sería *a priori* tan importante como la de un factor de

A. fumigatus del tipo Mac1 (en *A. fumigatus* no existen ortólogos obvios de Mac1 y los más parecidos son los factores codificados por los genes AFUA_2G01190 y AFUA_6G07780). En cualquier caso, la regulación de la homeostasis del cobre también podría ser esencial para la virulencia de *A. fumigatus*, de la misma manera que lo es para la virulencia de *Cryptococcus neoformans* (Waterman *et al.*, 2007). De hecho, en la región promotora del gen *sodA* de *A. fumigatus*, que codifica una Cu/Zn superóxido dismutasa citosólica, se encuentra un motivo ZR al que podría unirse ZafA para regular la expresión de este gen en función de la concentración ambiental de zinc (Calera and Hass, 2009). Precisamente, este caso representa uno de los mejores ejemplos para ilustrar la influencia que podría tener la alteración de la homeostasis del zinc y/o del cobre sobre la actividad de un enzima como es la Cu/Zn-SOD que podría ser utilizada por *A. fumigatus* para defenderse de los efectos dañinos del radical superóxido (O_2^-) (Philippe *et al.*, 2003). No obstante, estudios recientes indican que la acción de la Cu/Zn-SOD no parece relevante para garantizar la supervivencia del hongo frente a las formas tóxicas del oxígeno debido a que la actividad SOD en *A. fumigatus* es intracelular y que a pesar de tener cuatro genes que codifican proteínas tipo SOD un triple mutante *sodAΔsodBΔsodCΔ* es tan virulento como la cepa silvestre (el gen *sodD* es esencial) (Lambou *et al.*, 2010). Sin embargo, una búsqueda detallada realizada sobre el genoma de *A. fumigatus* ha revelado que posee un gen adicional que codifica para una posible Cu/Zn-SOD con péptido señal y que posiblemente es secretada, similar a la Sod5 de *Candida albicans* (Martchenko *et al.*, 2004). Por consiguiente, en realidad, de los estudios realizados por Lambou *et al.* (2010) no se puede concluir que la actividad SOD sea irrelevante para la virulencia de *A. fumigatus* ya que precisamente la Cu/Zn-SOD que con más fundamento debería haber sido deletada para analizar la virulencia de la cepa resultante no ha sido considerada. Por tanto, el hecho de que las hifas de un mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* sean eliminadas por efecto de la actividad fagocítica residual de ratones neutropénicos, como lo revela la presencia de restos de paredes celulares de *A. fumigatus* en pulmones de ratones infectados con la cepa *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ*, sugiere que este mutante podría tener alterada, además de la propia capacidad de crecimiento de la cepa, su capacidad de defensa frente a las formas tóxicas del oxígeno que podrían ser producidas por las pocas células fagocíticas presentes en el hospedador inmunosuprimido, como consecuencia de su incapacidad para obtener suficiente cantidad de zinc.

La capacidad de germinación de los conidios constituye un aspecto determinante en la virulencia de *A. fumigatus* ya que una cepa incapaz de germinar no causará daño al hospedador. Por ejemplo, el porcentaje de germinación de mutante *zafAΔ* en medios limitantes en zinc es muy bajo en comparación con la cepa silvestre por lo que esta cepa es avirulenta (Moreno *et al.*, 2007b). Actualmente se desconoce de qué manera acumulan zinc las esporas de *Aspergillus*. No obstante, es muy probable que el zinc sea almacenado durante el proceso de esporogénesis en la vacuola de manera similar a como *S. cerevisiae* acumula zinc cuando crece en medios repletos de zinc (MacDiarmid *et al.*, 2003). El zinc acumulado servirá para satisfacer la gran demanda de zinc requerida por numerosos

factores de transcripción que entran en acción durante la reprogramación de la expresión génica que ocurre durante el proceso de germinación. La movilización del zinc vacuolar debe depender del transportador ZrfF de *A. fumigatus* cuya expresión depende de ZafA. Posiblemente por esta razón el 50% de las esporas de una cepa *zafAΔ*, aunque se hinchan, no pueden emitir tubo germinativo. No obstante, la mitad de las esporas son capaces de germinar (aunque tras la emisión del tubo germinativo la extensión de las hifas es limitada) lo que indicaría la existencia de un mecanismo para movilizar reservas intracelulares de zinc independiente del factor ZafA. En este caso, es posible que el zinc también se pueda almacenar en zincosomas como ocurre en *S. cerevisiae* (Devirgiliis *et al.*, 2004). Sea como sea, al contrario de lo que ocurre con la cepa *zafAΔ*, la capacidad de germinación de las esporas de una cepa *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* en medios limitantes en zinc está mínimamente alterada por lo que la reducción en la virulencia de esta cepa no depende de la capacidad de germinación ni, por consiguiente, de la capacidad para movilizar el zinc intracelular durante la germinación y elongación del tubo germinativo.

Finalmente, aunque algunos estudios previos han demostrado que el régimen inmunosupresor puede influir en la virulencia de determinadas cepas (Balloy *et al.*, 2005; Stephens-Romero *et al.*, 2005; Spikes *et al.*, 2008), en el caso de una cepa mutante *zrfAΔzrfBΔzrfCΔ* el régimen de inmunosupresor administrado no influye en el resultado y en cualquier caso es avirulenta, lo que refuerza la hipótesis de que una de las principales razones de la falta de virulencia de esta cepa es su incapacidad para crecer dentro de un hospedador porque su capacidad de obtención de zinc a partir de un medio tan limitante en zinc como son los tejidos vivos ha sido anulada. Aunque esta capacidad reside principalmente en la función de ZrfC, los transportadores ZrfA y ZrfB también deben contribuir a la adquisición de zinc a partir de tejidos, como prueba el hecho de que una cepa *zrfCΔ* conserve cierta capacidad patogénica que es eliminada totalmente con la delección de *zrfA* y *zrfB*. Es más, la capacidad de ZrfC para obtener zinc en estas condiciones reside en su extremo amino, que según las predicciones topológicas estaría orientado hacia el espacio periplásmico. Este último aspecto es especialmente interesante desde el punto de vista quimioterapéutico por dos razones: (1) no existen ortólogos de ZrfC en la especie humana por lo que podría constituir una diana ideal y, (2) si la predicción topológica de la disposición de ZrfC en la membrana plasmática es correcta, la diana estaría fácilmente accesible para interactuar con una posible droga desarrollada contra esta proteína.

En resumen, la homeostasis del zinc es un proceso fundamental en el crecimiento de *A. fumigatus*. En particular, la capacidad del hongo de obtener zinc del ambiente alcalino y extremadamente limitante en este catión que constituyen los tejidos vivos es esencial para su capacidad patogénica. Por tanto, este aspecto de la biología del hongo podría representar una nueva diana molecular sobre la que desarrollar quimioterapéuticos eficaces contra la aspergilosis pulmonar invasiva.



CONCLUSIONES

1. La represión parcial de la expresión que sufren los genes *zrfA* y *zrfB* a pH alcalino es realizada por el factor PacC.
2. El gen *zrfC* codifica un transportador de zinc de la familia ZIP que presenta un extremo amino distintivo que es esencial para la funcionalidad de la proteína. Las particularidades estructurales determinadas por este extremo amino permiten establecer una nueva subfamilia de proteínas ZIP, constituida por transportadores tipo ZrfC presentes exclusivamente en hongos.
3. La capacidad de *A. fumigatus* para crecer en medios alcalinos muy limitantes en zinc depende principalmente de la función de la proteína ZrfC y de manera secundaria de la función de ZrfB. Por el contrario, la proteína ZrfA contribuye mínimamente a la capacidad de *A. fumigatus* para crecer en esas condiciones.
4. La proteína Aspf2 realiza alguna función en la homeostasis del zinc que es necesaria para el crecimiento de *A. fumigatus* en medios extremadamente limitantes en zinc, particularmente a pH alcalino.
5. La expresión de los genes *zrfC* y *aspf2* está regulada conjuntamente por los factores de transcripción ZafA y PacC. Sin embargo, en contra del modelo propuesto de regulación por PacC en *A. nidulans*, el factor PacC de *A. fumigatus* no es necesario para activar la transcripción de estos genes a pH alcalino, sino que lo es para reprimirla a pH ácido.
6. La capacidad de *A. fumigatus* para adquirir zinc a partir de tejidos vivos reside principalmente en la función del transportador ZrfC, siendo fundamental el extremo amino característico de la proteína para realizar este cometido. No obstante, los transportadores ZrfA y ZrfB también contribuyen en menor medida en este proceso. En cualquier caso, la capacidad de adquirir zinc a partir de tejidos vivos es determinante para la virulencia de *A. fumigatus*, independientemente del patrón inmunosupresor administrado.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Microorganismos y medios de cultivo empleados

Los microorganismos y cepas utilizadas en este trabajo se encuentran recopilados en la Tabla 1M. Se utilizaron tres tipos de medios de cultivo: medios para cultivar *Escherichia coli*, para el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* y para cultivar *Aspergillus fumigatus*.

Tabla 1M. Cepas utilizadas en este trabajo.

| Microorganismo | Cepa | Genotipo relevante | Referencia |
|----------------------|--------|--|---|
| <i>A. fumigatus</i> | CEA17 | <i>pyrG1</i> | d'Enfert (1996) |
| | AF10 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG-pyrG-hisG</i> | Vicente-franqueira <i>et al.</i> (2005) |
| | AF14 | Silvestre (isogénica de CEA17) | |
| | AF15 | <i>pyrG1 zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG</i> | |
| | AF17 | <i>zafAΔ::hisG-pyrG-hisG</i> | Moreno <i>et al.</i> (2007b) |
| | AF17I | <i>zafAΔ pyrG⁺</i> locus original | Moreno <i>et al.</i> (2007b) |
| | AF48 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG pyrG⁺</i> locus original | Este trabajo |
| | AF52 | <i>pyrG1 zrfCΔ::lacI</i> | |
| | AF56R | <i>zafA::pyrG-hisG</i> | |
| | AF58 | <i>pacC^{1598→2215Δ}::pyrG</i> | Este trabajo |
| | AF60 | <i>pacC^{1598→1855Δ}::pyrG</i> | |
| | AF251 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI-pyrG-lacI</i> | |
| | AF2511 | <i>pyrG1 zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI</i> | |
| | AF431 | <i>zrfCΔ::lacI-pyrG-lacI</i> | |
| | AF541 | <i>zrfCΔ pyrG⁺</i> locus original | |
| | AF721 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺</i> locus original | |
| | AF731 | <i>ZrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfC→zrfC</i> | |
| | AF751 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfA→zrfA</i> | |
| | AF761 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfB→zrfB</i> | |
| | AF771 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfC→zrfB</i> | |
| | AF781 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfB→zrfC</i> | |
| | AF791 | <i>zrfAΔ::neo zrfBΔ::hisG zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfC→zrfA^{13-622Δ}</i> | |
| | AF801 | <i>zrfCΔ::lacI pyrG⁺::PzrfC^{PR*}→zrfC</i> | |
| | AF811 | <i>aspf2Δ::lacI-pyrG-lacI</i> | |
| | AF861 | <i>pyrG1 aspf2Δ::lacI</i> | |
| | AF871 | <i>aspf2Δ::lacI pyrG⁺</i> locus original | |
| | AF881 | <i>aspf2Δ::lacI pyrG⁺::aspf2</i> | |
| | AF891 | <i>aspf2Δ::lacI pryG⁺::Paspf2PR→aspf2</i> | |
| <i>E. coli</i> | DH5α | <i>F⁻, φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrAB, thi-1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF) U169, phoA</i> | Hanahan (1983) |
| <i>S. cerevisiae</i> | DY1457 | <i>MATα ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i> | Zhao and Eide (1996) |
| | ZHY3 | <i>MATα ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3</i> | |

1.1. Medios empleados para el cultivo de *E. coli*

- **Luria Bertani (LB):** se utilizó para el crecimiento rutinario de *E. coli*. Su composición es: 10 g/L bacto-triptona (Difco), 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl (pH 7,0). El medio LB selectivo (**LB amp**) se preparó suplementando el medio LB con ampicilina (0,1 mg/mL) a partir de un stock de ampicilina (100 mg/mL) conservado a -20° C. Para preparar LB sólido en placas Petri se añadió 15 g/L de agar.

1.2. Medios empleados para el cultivo de *S. cerevisiae*

- **Yeast Potato Dextrose Agar (YEPD):** 10 g/L extracto de levadura; 20 g/L peptona; 20 g/L glucosa. Para el crecimiento de la cepa ZHY3 el medio se suplementó con 0,28 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- **Synthetic Dextrose Ammonium plus CSM (SDA-CSM):** 5,7 g/L YNB (BIO 101, Inc. # 4028-812 with ammonium sulfate w/o amino acids, dextrose, copper, zinc, phosphates, iron.); 1,0 g/L KH_2PO_4 ; 20 g/L glucosa; 0,28 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mL/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7,4 mM); 0,1 mL/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,6 mM). El medio se suplementó con la mezcla CSM adecuada según las auxotrofías de la cepa utilizada: 0,77 g/L CSM-ura (BIO 101, Inc. #4511-212) o 0,65 g/L CSM-his-leu-ura (BIO 101, Inc. #4531-212).
- **Synthetic Dextrose Ammonium EDTA Buffered plus CSM (SDAEB-CSM):** 5,7 g/L YNB (BIO 101, Inc. # 4028-812 with ammonium sulfate w/o amino acids, dextrose, copper, zinc, phosphates, iron.); 20 g/L glucosa; 1,35 mL/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7,4 mM); 3,125 mL/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,6 mM); X g/L CSM adecuado (igual que en SDA-CSM). El pH se ajustó a 6,9 con NaOH 5 M. Para tamponar el pH a 4,4 se añadió 13,6 g/L KH_2PO_4 ; para tamponarlo a pH 7,5 se añadió 2,536 g/L KH_2PO_4 y 14,17 g/L K_2HPO_4 . Finalmente se añadió EDTA a una concentración final de 1 mM para el medio ácido y de 0,1 mM para el medio alcalino.

1.3. Medios empleados para el cultivo de *A. fumigatus*

- ***Aspergillus* Minimal Medium (AMMH):** 0,92 g/L tartrato amónico; 0,52 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,52 g/L KCl; 1,52 g/L KH_2PO_4 ; 1 mL/L solución elementos traza de Hutner (1000X); 10 g/L glucosa. El pH se ajustó a 7 con NaOH 5 M.
- ***Aspergillus* Minimal Medium Sucrose (AMMHS):** AMMH suplementado con 342,3 g/L sacarosa (1,0 M).
- **Synthetic Dextrose Ammonium limitante en zinc (SDA-Zn):** 1,7 g/L YNB (Q-BIOgen # 4029-112, w/o ammonium sulfate, dextrose, amino acids and Zn); 20 g/L glucosa; 5 g/L $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (pH 4,2).
- **Synthetic Dextrose Nitrate limitante en zinc (SDN-Zn):** 1,7 g/L YNB (Q-BIOgen # 4029-112, w/o ammonium sulfate, dextrose, amino acids and Zn); 20 g/L glucosa; 3 g/L

NaNO₃; 0,6mL/L FeSO₄-7 H₂O (20 mM); 3,75 mL/L CuSO₄-5 H₂O (1,6 mM); 1 mL/L Na₂MoO₄-2 H₂O (10 mM). El pH se ajustó a 7,7 con NaOH 5M.

- **SDAE-Zn y SDNE-Zn:** para hacer los medios SDA-Zn y SDN-Zn más limitantes en zinc se añadió 1,25 mL/L Na₂EDTA (200 mM pH 8).
- **Potato Dextrose Agar (PDA):** 20 g/L Potato Dextrose Agar (Difco); 20 g/L sacarosa; 2,5 g/L MgSO₄-7 H₂O; 1,0 mL/L solución elementos traza de Hutner 1000×; 10 g/L de agar. El pH se ajustó a 6,5 con NaOH 5 M.
- **Suero Bovino (BS) :** 10-70% (v/v) de *Bovine Serum* (GIBCO 16170-078) 1 g/L glucosa y 15 g/L agar.
- **Suero Bovino Fetal (FBS):** 10-50% (v/v) de *Foetal Bovine Serum* (GIBCO 10106-169) 1 g/L glucosa y 15 g/L agar.
- **Solución de elementos traza de Hutner (1000×):** 11 g/L BO₃H; 22 g/L SO₄Zn-7 H₂O; 5,0 g/L Cl₂Mn-4 H₂O; 5,0 g/L FeSO₄-7 H₂O; 1,6 g/L CoCl₂-H₂O; 1,6 g/L SO₄Cu-5 H₂O; 1,1 g/L Na₂MoO₄-H₂O; 50 g/L Na₂EDTA.

Los medios de composición definida utilizados para el crecimiento de cepas *pyrG*⁻ se suplementaron con 0,5 g/L de uracilo y 1,2 g/L de uridina. Para hacer medios sólidos se añadió 20 g/L de agar. Todos los medios y soluciones se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 20 minutos. En todos los casos la fuente de carbono (glucosa) se esterilizó separadamente en autoclave. Los medios se guardaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

1.4. Preparación y limpieza de recipientes para medios y cultivos

Los medios de cultivo se prepararon con agua Milli-Q utilizando reactivos de la mejor calidad (Merck) para minimizar en lo posible la contaminación de los medios o soluciones con trazas de zinc. Además, estos medios se almacenaron en botellas de vidrio previamente lavadas con una solución de EDTA 3 mM (pH 8,0) y enjuagadas varias veces con abundante agua Milli-Q con el propósito de reducir al mínimo las trazas de iones metálicos adheridas a las paredes de los recipientes. Los matraces empleados para el cultivo del *Aspergillus* se lavaron de la misma manera.

2. Crecimiento de *A. fumigatus*

Con el fin de obtener conidios frescos para la inoculación de medios, se hicieron resiembras en medio (PDA) con 10⁵ esporas por placa Petri usando conidios recogidos de placas mantenidas a 4° C. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 días en atmósfera húmeda. Las suspensiones de conidios frescos se obtuvieron añadiendo a las placas esporuladas de *A. fumigatus* una solución acuosa estéril de Tween 80 al 0,05% y raspando

la superficie de la placa suavemente con un asa de cultivo estéril. La suspensión de conidios se sedimentó por centrifugación a $1500 \times g$ durante 10 minutos a 4°C en tubos estériles de fondo cónico y se lavaron 2 veces con la solución de Tween 80 al 0,05% para eliminar restos de hifas, así como para deshacer los posibles agregados de conidios. Finalmente, los conidios se resuspendieron por agitación vigorosa en la solución de Tween 80 al 0,05%, se calculó su concentración con ayuda de una cámara cuentaglóbulos Thoma y se comprobó la ausencia de micelio y de agregados de conidios. Esta suspensión homogénea de conidios se consideró fresca hasta un máximo de dos semanas, pasadas las cuales se obtuvieron nuevamente conidios frescos. Estas suspensiones frescas fueron las utilizadas para inocular los medios, tanto sólidos como líquidos, de todos los estudios realizados.

Las **curvas de crecimiento** de *A. fumigatus* se realizaron representando el peso seco del micelio por unidad de volumen a lo largo del tiempo. Para ello, se filtraron muestras de 10 mL de cultivo a tiempos fijos a través de filtros de fibra de vidrio usando como soporte una torre de filtración conectada a una bomba de vacío. Posteriormente, los filtros con el micelio se secaron en una estufa a 70°C hasta peso constante. Los valores de peso seco se expresaron en mg de micelio por mL de cultivo. Los correspondientes filtrados de cultivo se recolectaron para determinar el pH (a 25°C).

La **tasa de germinación** de los conidios se determinó cuantificando el porcentaje de germinación cada hora, a partir de las 4 horas de incubación y hasta las 10 horas de cultivo. Para ello se inocularon 10^7 esporas/mL de medio de cada una de las cepas en 10 mL de cada uno de los medios ensayados y se incubó a 37°C en agitación durante 10 horas. A partir de las 4 horas de incubación se tomó, cada hora, una alícuota de 1 mL de medio que se sonicó 10 segundos a máxima potencia (ciclo 1 y amplitud 100%) para separar los agregados de conidios y/o de hifas que se pudieran haber formado. En ese momento, con ayuda de una cámara cuentaglóbulos Thoma, se calculó el porcentaje de germinación refiriendo el número de conidios germinados (se consideró que un conidio había germinado cuando la longitud del tubo germinativo era mayor que el diámetro del propio conidio) al número total de conidios y multiplicando por 100. Este cálculo se realizó por duplicado en cada uno de los tiempos y posteriormente se utilizó la media aritmética de los valores obtenidos para representar el porcentaje de germinación.

Los datos obtenidos para cada cepa y medio se representaron gráficamente para su comparación y análisis con ayuda del programa informático GraphPad Prism 4.0 (GraphPad software, inc.).

3. Plásmidos utilizados para generar cepas mutantes

Todos los plásmidos utilizados en este estudio se encuentran recopilados en la **Tabla 2M**. En este apartado únicamente se detalla la construcción de aquellos plásmidos que no han

sido ya descritos en las secciones de materiales y métodos de los artículos incluidos en la memoria.

El plásmido pZRF28 fue diseñado para reintroducir el gen *zrfB* bajo el control del promotor de *zrfC*, mientras que el plásmido pZRF310 fue diseñado para reintroducir el gen *zrfC* bajo el control del promotor de *zrfB*. En ambos casos la estrategia consistió en expresar estos genes en el locus *pyrG* de la cepa AF2511 de *A. fumigatus* utilizando uno de los derivados de pPYRGQ3 como vector, bien el que lleva el promotor de *zrfB* insertado (pPYRGQ4) o bien el que lleva el promotor de *zrfC* insertado (pPYRGQ5) (artículo 2).

Para construir pZRF28, el fragmento NheI-HpaI de pZHA2 (1,1 kb), que contiene la ORF del gen *zrfB* (Vicentefranqueira *et al.*, 2005), fue ligado al pPYRGQ5 digerido con XbaI-SmaI.

Para construir el pZRF310, se insertó el fragmento BglII-HpaI de pZRF39 (1,73 kb), que contiene la ORF del gen *zrfC* (artículo 2), en el pPYRGQ4 digerido con BglII-SmaI.

Tabla 2M. Plásmidos utilizados en este trabajo.

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|-------------|---|--|
| pACTF1 | Porta el gen <i>actG</i> de la γ -actina de <i>A. fumigatus</i> | Este trabajo |
| pASPF23 | Porta el ADNc de <i>asf2</i> de <i>A. fumigatus</i> | |
| pASPF24 | Porta el gen <i>asf2</i> y las secuencias flanqueantes | |
| pASPF25 | pASPF23 en el que se ha sustituido el gen <i>asf2</i> por el fragmento SmaI-XhoI de 3,64 kb de pPYRGQ4 portando <i>lacI-pyrG-lacI</i> | |
| pASPF26 | pPYRGQ3 con el fragmento HpaI-NheI de 1,87 kb de pASPF24 | |
| pASPF361 | pASPF26 con los sitios PR del promotor <i>zrfC-asf2</i> mutados | |
| pGEM-T-Easy | Plásmido comercial utilizado para clonar fragmentos de PCR | PROMEGA |
| pMC5-HSET | Derivado del pRS316 que porta el gen <i>ZRT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> | Gitan <i>et al.</i> (1998) |
| pPAC2 | Porta parte de la secuencia de <i>pacC</i> de <i>A. fumigatus</i> (1-1597) | Este trabajo |
| pPAC3 | pPAC2 contiene el gen <i>pyrG</i> de <i>A. niger</i> | |
| pPAC4 | pPAC3 con 2,31 kb aguas debajo de <i>pacC</i> | |
| pPAC7 | pPAC4 con 382 pb de la secuencia 3' de la ORF de <i>pacC</i> (nucleótidos 1861-2215) | |
| pPAC9 | Porta la ORF completa de <i>pacC</i> (2,23 kb) | |
| pPYRG | Porta el gen <i>pyrG</i> de <i>A. niger</i> y las regiones flanqueantes | |
| pPYRG* | Porta un fragmento SpeI-BglII de 1,22 kb del <i>pyrG</i> de <i>A. fumigatus</i> | |
| pPYRG4 | Derivado del pGEM-T-easy portando el marcador <i>lacI-pyrG-lacI</i> flanqueado por sitios de restricción | |
| pPYRGQ3 | Utilizado para obtener cepas <i>pyrG</i> ⁺ expresando un gen de interés en el locus <i>pyrG</i> | |
| pPYRGQ4 | Derivado del pPYRGQ3 para expresar el gen de interés bajo el control del promotor de <i>zrfB</i> | |
| pPYRGQ5 | Derivado del pPYRGQ3 para expresar el gen de interés bajo el control del promotor de <i>zrfC</i> | |
| pRS316 | Plásmido centromérico para expresión de genes en <i>S. cerevisiae</i> | Sikorski and Hieter (1989) |
| pZHA1 | pMC5-HSET en el que el fragmento NheI-HpaI ha sido reemplazado por la región codificante de <i>zrfA</i> | Vicentefranqueira <i>et al.</i> (2005) |
| pZHA2 | pMC5-HSET en el que el fragmento NheI-HpaI ha sido reemplazado por la región codificante de <i>zrfB</i> | |
| pZSF30 | pMC5-HSET con el fragmento SacI-HpaI de 2,18 kb de pZRF3 | Este trabajo |
| pZSF310 | pZSF portando el fragmento BglII-HpaI de 1,09 kb de pZRF30c | |
| pZRF1g | Porta un fragmento de 3,09 kb conteniendo el gen <i>zrfA</i> de <i>A. fumigatus</i> | Vicentefranqueira <i>et al.</i> (2005) |
| pZRF19 | pPYRGQ3 con el fragmento SpeI-EcoRV de 2,6 kb de pZRF1g | Este trabajo |

| | | |
|---------|--|---|
| pZRF24g | Porta un fragmento de 4,24 kb conteniendo el gen <i>zrfB</i> de <i>A.fumigatus</i> | Vicente-franqueira <i>et al.</i> (2005) |
| pZRF27 | pPYRGQ4 con el fragmento NheI-HpaI de 1,1 kb de pZHA2 | Este trabajo |
| pZRF28 | pPYRGQ5 con el fragmento NheI-HpaI de 1,1 kb de pZHA2 | |
| pZRF30 | Porta el ADNc de <i>zrfC</i> | |
| pZRF33 | pGEM-T-easy con un fragmento de 1,72 kb aguas debajo de <i>zrfC</i> | |
| pZRF34 | pPYRG4 con el fragmento HpaI-NheI de 1,86 kb de pASPF24 que contiene la región aguas arriba de <i>zrfC</i> | |
| pZRF35 | pZRF34 con el fragmento SpeI-XmnI de 1,7 kb de pZRF33 | |
| pZRF39 | pGEM-T-easy con el fragmento de 1,75 kb conteniendo la región codificante de <i>zrfC</i> | |
| pZRF310 | pPYRGQ4 con el fragmento BglII-HpaI de 1,73 kb de pZRF39 | |
| pZRF313 | pPYRGQ5 con el fragmento BglII-HpaI de 1,73 kb de pZRF39 | |
| pZRF316 | pGEM-T-easy con el fragmento de 1,14 kb conteniendo la región codificante de <i>zrfC</i> ^{$\Delta 13-622$} | |
| pZRF317 | pPYRGQ5 con el fragmento BglII-HpaI de 1,12 kb de pZRF316 | |
| pZRF320 | pZRF313 con los sitios PR del promotor <i>zrfC-aspf2</i> mutados | |
| pZRF33 | pZRF30 con el fragmento SphI-BglII conteniendo el promotor del gen <i>ZRT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> | |

4. Construcción y selección de cepas mutantes de *A. fumigatus*

Para obtener las cepas mutantes de *A. fumigatus* se utilizó la cepa auxotrófica para uracilo CEA17 (d'Enfert, 1996) u otras cepas derivadas de ella. La técnica utilizada para la obtención de cepas mutantes fue la del reemplazamiento génico. Para ello se utilizó como marcador de selección el gen *pyrG*, bien flanqueado por dos secuencias idénticas no presentes en el genoma del hongo (en el caso de los mutantes simples, dobles o triples) o bien adyacente al gen reintroducido (en el caso de los revertientes en el locus *pyrG*).

4.1. Obtención de protoplastos de *A. fumigatus*

Para obtener protoplastos de *A. fumigatus* se inocularon 50 ml de medio AMMHU (AMMH + 5mM uracilo + 5mM uridina) con 8×10^8 conidios/mL de una cepa *pyrG*⁻ y se incubó durante 13-15 horas a 28° C con agitación orbital de 200 rpm, hasta que los tubos germinativos alcanzaron una longitud de aproximadamente 4 veces el diámetro de las esporas. En ese momento se recogieron los conidios germinados (10 minutos a 2100 × g), se retiró el sobrenadante con bomba de vacío y se lavaron 2 veces con 10 mL de 0,6 M SO₄Mg-7 H₂O. En ese momento se resuspendieron en 50 mL de la solución de enzimas líticas (8 mL de 1,2 M SO₄Mg-7 H₂O, 1 mL de BSA [10 mg/mL en H₂O], 100 mg de glucanex [Sigma #L1412], 200 µL de β-glucuronidasa [Sigma #G885], 100 µL de Zymoliasa 20T [50 mg/mL en H₂O], 80 µL de 1 M K₂HPO₄ y 920 µL 1 M KH₂PO₄) en un matraz de 50 mL y se incubaron a 32° C durante 4 horas en agitación suave (100 rpm). Tras este periodo de incubación se comprobó la formación de protoplastos poniendo dos gotitas del cultivo en un portaobjetos y añadiendo a una de ellas un pequeño volumen de SDS al 10%. Para eliminar todo lo que no fuesen protoplastos se dividió la suspensión en 2 tubos de 50 ml, se diluyó cada alícuota con 1,2 M SO₄Mg-7 H₂O hasta 20 mL y se recubrió con 20 mL de tampón TB (0,6 M sorbitol, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5) dejándolo

resbalar por las paredes del tubo para conseguir crear una interfase entre las 2 soluciones; en la interfase quedaron los protoplastos tras centrifugar a $1000 \times g$ 50 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga de rotor oscilante sin freno. Se extrajeron los protoplastos de la interfase y se aumentó el volumen a 40 mL con tampón ST (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), se mezcló por inversión, se centrifugó a $520 \times g$ durante 8 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante con bomba de vacío. Se resuspendieron los protoplastos en 5 mL de tampón STC (1 M sorbitol; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM CaCl_2) y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente los protoplastos se sedimentaron por centrifugación breve, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en dos alícuotas de 300 μL de STC.

4.2. Transformación *A. fumigatus*

Los plásmidos que contenían el ADN transformante (aproximadamente 40 μg de plásmido) se linealizaron con la enzima de restricción adecuada. El ADN se purificó mediante una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico y otra con cloroformo:isoamílico. Posteriormente se precipitó con 0,1 volúmenes de AcNa 3 M y 0,7 volúmenes de isopropanol, se lavó con etanol 70%; se resuspendió en 30 μL de H_2O + 30 μL de STC y se analizó 1 μL en un gel de agarosa al 0,8%.

De las dos alícuotas de protoplastos (300 μL), una se utilizó para realizar la transformación, mientras que la otra sirvió de control de la misma. Así se añadieron los 60 μL de la solución de ADN transformante (mezcla problema) a una alícuota y 60 μL de STC sin ADN a la otra (mezcla control). A cada una de las mezclas se añadieron 75 μL de solución PEG 60% (PEG 4000 ó 6000 en STC) mezclándolo por suave pipeteo y se incubó durante 20 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se añadieron 750 μL de PEG 60% a cada mezcla y se incubaron durante 20 minutos más a temperatura ambiente. Después se sedimentaron los protoplastos a $2700 \times g$ durante 1 minuto a temperatura ambiente en una microcentrífuga, se retiró el PEG y se resuspendieron los protoplastos en 200 μL de STC.

Por otra parte, se prepararon cuatro alícuotas de agar blando líquido atemperado a 45°C tres de AMMHS + 0,25% agar y una de AMMHSU + 0,25% agar. A dos alícuotas de agar blando AMMHS se añadieron 0,1 mL de la mezcla de transformación problema, vertiéndose después cada una de ellas sobre una placa de AMMHS. De manera similar, a la tercera alícuota de AMMHS se añadieron 0,1 mL de la mezcla del control de transformación (sirve para detectar posibles contaminaciones por esporas del ambiente). Finalmente a la alícuota de AMMHSU se añadieron 0,1 mL de la mezcla del control de transformación (sirve para comprobar la capacidad de regeneración de los protoplastos). Todas las placas se incubaron a 37°C en ambiente húmedo durante 3-4 días hasta la formación de colonias. Cuando las colonias comenzaron a esporular se sembró cada colonia en el centro de una placa de AMMH, utilizando palillos humedecidos en Tween 80 al 1%. Estas placas se incubaron en las mismas condiciones que las anteriores hasta la formación de esporas. Se hicieron resiembras en estría de cada cepa en placas de AMMH

con el fin de obtener colonias aisladas. Finalmente, esporas de una colonia aislada de cada transformante independiente utilizaron para inocular una placa de PDA por transformante. Las esporas se recolectaron y se conservaron a -80°C en glicerol al 20% (v/v).

4.3. Selección de mutantes de *A. fumigatus*

Para poder realizar el análisis simultáneo de un alto número de cepas transformantes se obtuvo ADN genómico (ANDg) de conidios, para analizarlo por PCR. Este método resulta muy eficaz para descartar aquellas cepas que no han experimentado un proceso de recombinación homóloga y, por tanto, para reducir el número de cepas que se han de analizar mediante Southern-blot. Así, para obtener el ADNg se partió de 1 mL de una suspensión de esporas (10^9 conidios/mL), éstas se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en 0,1 mL de solución A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA), se añadió 0,1 mL de solución B (0,2 M NaOH, 1% SDS), se incubaron en un baño a 65°C durante 40 minutos tras lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se añadió 0,1 mL de solución C (3 M acetato potásico, pH 5,5) y clarificó la suspensión mediante centrifugación a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 8 minutos a 4°C . El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos sin tocar el precipitado, se añadieron 0,15 mL de H_2O y se precipitó el ADN con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 0,7 volúmenes de isopropanol. Tras centrifugación a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 20 minutos a 4°C se retiró el sobrenadante, se lavaron las muestras de ADNg con 0,3 mL de etanol al 70%, se dejaron secar al aire los precipitados unos minutos y se resuspendieron en 10 μL de H_2O .

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μL , utilizando 1 μL de la solución de ADNg obtenida para cada colonia. Las condiciones para la PCR empleadas fueron las siguientes: 58°C de temperatura de anillamiento, 1 minuto de tiempo de elongación por cada kb de ADN a una temperatura de 72°C y 35 ciclos.

4.4. Obtención de cepas *pyrG*⁻ a partir de cepas mutantes *pyrG*⁺ ectópicas

Los marcadores utilizados para delecionar los genes en estudio contienen el gen *pyrG* como marcador de selección flanqueado por dos regiones idénticas no presentes en el genoma del hongo (*hisG* o *lacI*). Estas regiones permiten que ocurra espontáneamente un proceso de recombinación intracromosomal que elimina el marcador *pyrG*, recuperándose la auxotrofia *pyrG*⁻. Para seleccionar las cepas en las que ocurre este proceso se realizaron resiembras sucesivas en medio AMMHU suplementado con ácido 5'-fluororótico (5'-FOA) (Fermentas #R0811). Este compuesto sirve de sustrato para la orotidina monofosfato decarboxilasa (proteína codificada por el gen *pyrG*) que produce un análogo tóxico del 5-UTP, el 5F-UTP, que bloquea la transcripción. Por tanto, las esporas que hayan perdido el gen *pyrG* crecerán normalmente en medio con 5'-FOA, mientras que conserven el gen *pyrG* se intoxicarán y no podrán crecer. Finalmente, las cepas recuperadas se cultivaron

simultáneamente en placas AMMH y AMMHU, para comprobar que efectivamente habían perdido el gen *pyrG* y eran auxótrofas para uracilo/uridina.

5. Detección y manipulación de ácidos nucleicos

Las manipulaciones y análisis de ácidos nucleicos, a excepción de la obtención y detección de ácidos nucleicos de *A. fumigatus* se realizaron esencialmente de acuerdo a los protocolos estándar descritos en (Sambrook *et al.*, 2001).

5.1. Obtención de ADN_g genómico de *A. fumigatus* y análisis por Southern-blot

El ADN_g de *A. fumigatus* se obtuvo de micelio obtenido a partir de un cultivo de 40 mL de AMMH inoculado con 4×10^7 conidios e incubado a 37° C en agitación (200 rpm) durante 24 horas. Tras filtrar y lavar el micelio, éste se pulverizó en un mortero en presencia de N₂ líquido se pesó y se añadieron 3,2 mL de solución de lisis (20 mM HEPES, 1 M Sacarosa, 20 mM EDTA, pH 7,0) y un volumen adecuado de SDS al 10% (para dejarlo al 1% final). La mezcla se incubó a 65° C durante 15 minutos, se añadió un volumen de TE (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0) y se mezcló por inmersión. Las proteínas se extrajeron con un volumen de una mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) tantas veces como fue necesario y finalmente se hizo una extracción con un volumen de cloroformo:isoamílico. A la solución de ADN_g así obtenida se añadieron 20 µL de RNasa (10 mg/mL) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se precipitó el ADN con 0,1 volúmenes de 3 M acetato sódico (pH 5,5) y 0,7 volúmenes de isopropanol, se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 15 minutos a 6° C, se lavó la muestra con etanol al 70% y se resuspendió en un volumen adecuado de TE (10 mM Tris-HCl, 1 M EDTA, pH 8,0). Finalmente se analizó 1 µL de la solución de ADN_g obtenida en un gel de agarosa al 0,8%. El ADN_g se guardó a -20° C hasta su uso.

El ADN_g previamente digerido con las enzimas de restricción adecuadas (4 µg por muestra) se analizó mediante Southern-blot utilizando geles neutros de agarosa al 0,8%. El ADN se transfirió en condiciones neutras a membranas de nylon neutras (Hybond, Amersham) según el protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 2001). Las sondas utilizadas para la detección de los fragmentos de interés se marcaron por *random priming* con dUTP-Digoxigenina según las instrucciones del *DIG DNA Labelling Kit* (Roche). La hibridación y detección de las sondas se realizó por un método quimioluminiscente según las instrucciones del *DIG Nucleic Acid Detection Kit* (Roche).

5.2. Obtención de ARN total de *A. fumigatus* y análisis por Northern-blot

El ARN total de *A. fumigatus* se purificó a partir de muestras de micelio obtenidas de cultivos de 100 mL del medio correspondiente inoculados con 5×10^7 conidios e incubados a 37° C durante 24 horas. El micelio de cada muestra se pulverizó totalmente en un mortero en presencia constante de N₂ líquido y el ARN total se obtuvo a partir de 250 mg de micelio, de acuerdo a las instrucciones del RNeasy Plant mini kit (QIAGEN).

El ARN total (10 µg por muestra) se separó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa al 1% con formaldehído 2,2 M. El ARN se transfirió por capilaridad a membranas neutras de nylon según protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 2001). Las sondas utilizadas en experimentos de Northern-blot se marcaron por *random priming* con [α^{32} -P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo a las instrucciones del *Ready-To-Go DNA Labelling Beads (dCTP)* (Biotech Inc.). La prehibridación se realizó a 65° C durante 3 horas en el tampón de prehibridación (SSC 5×; SDS 0,5%; mezcla de Denhardt's 5×; 0,1 mg/mL de esperma de salmón desnaturalizado por calor). La hibridación se realizó a 65° C durante 15 horas en el tampón de hibridación (SSC 5×; 2× mezcla de Denhardt's; SDS 0,5%; 0,1 mg/mL de esperma de salmón desnaturalizado por calor). Tras la hibridación, las membranas se lavaron dos veces con SSC 5× + 0,1% SDS durante 20 minutos cada vez, a temperatura ambiente. Después se lavaron una vez con SSC 2× + 0,1% SDS durante 20 minutos a 42° C y a continuación se lavaron otra vez con SSC 0,2× + SDS 0,1% durante 20 minutos a 42° C. Finalmente se lavaron una vez con SSC 0,1× + SDS 0,1% durante 20 minutos a 65° C. Como control de calidad y cantidad de ARN se analizó el nivel de expresión del gen que codifica la γ -actina (*actG*) de *A. fumigatus*. Las membranas se expusieron durante 1-10 días a -80° C.

Las sondas utilizadas para detectar la expresión de los diferentes genes se encuentran recopiladas en la Tabla 3M.

Tabla 3M.

| Gen | Fragmento | Tamaño | Plásmido de procedencia |
|--------------|-------------|---------|-------------------------|
| <i>zrfA</i> | EcoRI-KpnI | 697 pb | pZRF1g |
| <i>zrfB</i> | StuI-SacI | 929 pb | pZRF24g |
| <i>zrfC</i> | BglII-SmaI | 1583 pb | pZRF30 |
| <i>aspf2</i> | XbaI-BamHI | 954 pb | pASPF23 |
| <i>pacC</i> | HpaI-SmaI | 1605 pb | pPAC2 |
| <i>actG</i> | EcoRI-EcoRI | 926 pb | pACTF1 |

6. Ensayos de virulencia en un modelo murino de aspergilosis invasiva

En cada ensayo de virulencia se utilizaron diez ratones machos CD-1, de seis semanas de edad y entre 20-30 gramos de peso. Los animales se mantuvieron durante todo el experimento en cajas estériles con presión positiva y aire estéril utilizando filtros HEPA. El alimento, el lecho, así como el agua utilizada eran estériles. La comida y el agua fueron administradas *ad libitum*. El agua de bebida se suplementó con tetraciclina (Sigma) a una concentración de 1 mg/mL para prevenir infecciones bacterianas y se cambió diariamente.

Los ratones se inmunodeprimieron utilizando dos protocolos distintos, dependiendo del experimento. En el primero ellos, los ratones se inmunosuprimen con **ciclofosfamida** (Genoxal 200 mg inyectable, Prasfarma, Almirall Prodesfarma) a una dosis de 150 mg/kg de peso utilizando una inyección intraperitoneal (con aguja 26GA 3/8) en los días -3, -1, +3, +6, +9 y +13, y con una inyección subcutánea de **acetato de hidrocortisona** (Sigma) (con aguja 22G 1 ½) en los días -3 y -1 a una dosis de 112,5 mg/kg de peso (entre 2,25-3,37 mg por ratón). En el segundo protocolo, los ratones se inmunosuprimen únicamente con **acetato de hidrocortisona** en inyección subcutánea a una dosis de 25 mg por ratón los días -3 y 0. En el día 0 se realizó la infección con *A. fumigatus*, previamente a la cual se sortearon los animales para minimizar posibles diferencias en las dosis de inmunosupresión. Para realizar la infección, los ratones se anestesiaron con una combinación una solución de cloruro de Ketamina (12,5 mg/mL) (Ketolar 50 mg inyectable, Parke-Davis S.L., Barcelona, España) y de clorhidrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun 2,33% inyectable, Bayer-Química Farmacéutica, Barcelona, España) en una proporción 5,4:0,6. De esta mezcla se inyectaron por vía intramuscular 0,1 mL por ratón (con aguja 26GA 3/8). Una vez anestesiados, la infección se realizó por inoculación intranasal de 30 µL de solución salina con 0,01 % Tween 20 conteniendo 10^4 10^5 ó 10^6 conidios de la cepa de *A. fumigatus* en estudio, utilizando una pipeta automática. En cada una de las inoculaciones se utilizaron dos grupos controles: (1) grupo control sin inmunosuprimir y sin inóculo y (2) grupo inmunosuprimido inoculado con 30 µl de solución salina con 0,01% Tween 20 sin esporas. La evolución de la supervivencia de todos los ratones se observó durante 15 días (Fig. 1M). Los datos obtenidos para cada cepa e inóculo se representaron gráficamente para su comparación y análisis con ayuda del programa informático GraphPad Prism 4.0 (GraphPad software, inc.).

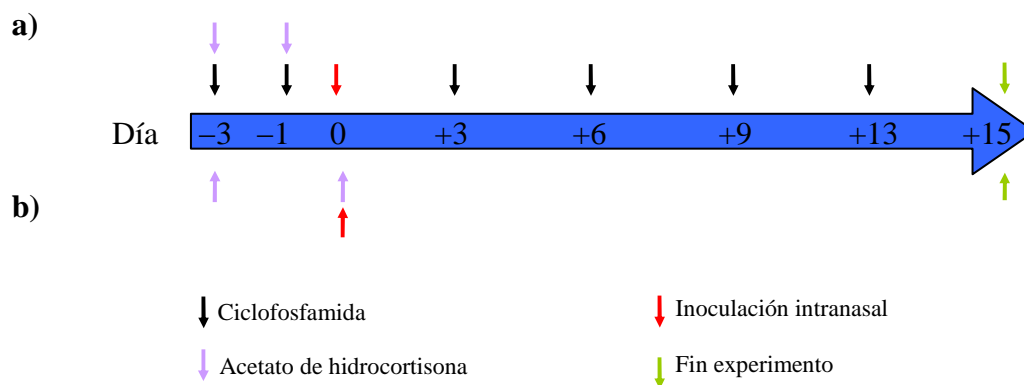


Fig. 1M. Cronograma del protocolo de inmunosupresión durante el desarrollo experimental de un modelo murino de aspergilosis pulmonar invasiva, utilizando el régimen **a)** de ciclofosfamida + cortisona o **b)** únicamente de cortisona.

6.1. Determinación de la carga fúngica

Para determinar la carga fúngica en ratones muertos de API, estos se diseccionaron para extraer los pulmones en condiciones asépticas. El pulmón derecho se fijó en formalina neutra al 10% para realizar cortes histológicos y el izquierdo se utilizó para determinar la carga fúngica. Para esto último, se pesó el pulmón y se homogeneizó en 4 mL de suero salino 0,85% sobre filtros BD Falcon Cell Strainer 100 μ M Nylon (BD Biosciences) para eliminar restos de tejido. Este homogenado se utilizó para determinar la carga fúngica mediante recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) y cuantificación de galactomanano.

Para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias se sembraron 300 μ l del homogenado en placas PDA (suplementadas con 1 mM de zinc para poder rescatar las cepas incapaces de crecer en medios limitantes en zinc), se incubaron 48 horas a 37° C y se contó el número de colonias que crecían en la placa. La carga fúngica se expresó como número de colonias por gramo de tejido pulmonar.

Para la cuantificación del galactomanano (GM) se utilizaron 300 μ l de una dilución 1/100 ó 1/200 del homogenado (dependiendo del número de ufc obtenido previamente) y se siguieron las instrucciones del kit Platelia® (Bio-Rad Laboratories). Este ensayo consiste en una determinación inmunoenzimática en sándwich que detecta el galactomanano de *Aspergillus fumigatus*. En presencia del antígeno GM se forma un complejo anticuerpo-GM-anticuerpo monoclonal/peroxidasa, de manera que al añadir la solución de revelado, que contiene peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y tetrametilbenzidina (TMB) se da una reacción enzimática en la que se oxida la TMB produciéndose color azul. Tras la reacción se añade ácido sulfúrico, que detiene la reacción y cambia el color a amarillo. La intensidad del color se mide con un espectrofotómetro a 450 nm. Por tanto, el resultado de esta prueba de ELISA es un valor de D.O., que está directamente relacionado

con la concentración de galactomanano presente en la muestra. El propio kit proporciona un control positivo (5,4 ng GM/mL) y un control umbral (1 ng GM/mL) que indica el límite inferior de sensibilidad del test. La medición de la D.O. obtenida en los controles y en diluciones 1/2 y 1/4 del control positivo, proporcionó los valores necesarios para realizar la recta patrón que se utilizó para calcular la concentración de GM presente en las muestras de pulmón. La cantidad de GM se expresó como µg de GM por gramo de tejido pulmonar.

6.2. Comprobación de las cepas reaisladas de animales infectados

Todas las cepas se comprobaron por PCR antes y después de la infección para descartar la existencia de contaminaciones entre cepas y/o de infecciones cruzadas. Los homogenados de pulmón se sembraron en placas PDA suplementadas con 1 mM de Zn^{2+} y cloranfenicol (50 mg/mL) y el ADN_g obtenido de colonias bien aisladas, se analizó por PCR utilizando parejas de oligonucleótidos específicas para cada una de las cepas mutantes.

6.3. Histología

Para el examen histológico se utilizó el pulmón derecho. Los pulmones se fijaron en formalina neutra al 10% durante un mínimo de 8 horas y posteriormente se transfirieron a una solución de etanol 70% donde se conservaron hasta su utilización. Para realizar los cortes histológicos, los pulmones se incluyeron en parafina y se hicieron secciones de 5 µm. Las secciones se tiñeron con el método de metenamina de plata de Gomori-Grocott (Huppert *et al.*, 1978) seguida de una contra-tinción con hematoxilina-eosina. De esta manera se pudo observar en una misma preparación tanto el crecimiento fúngico como los distintos tipos celulares presentes en el tejido pulmonar. Las micrografías se realizaron utilizando un microscopio óptico de campo claro y una magnificación de 40×, 100×, 200 ó 400×.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T. K., N. Saydam, F. Steiner, W. Schaffner and J. H. Freedman, (2002) Activation of gene expression by metal-responsive signal transduction pathways. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 5**: 813-817.
- Al-Alawi, A., C. F. Ryan, J. D. Flint and N. L. Muller, (2005) *Aspergillus*-related lung disease. *Can Respir J* **12**: 377-387.
- Amich, J., F. Leal and J. A. Calera, (2009) Repression of the acid ZrfA/ZrfB zinc-uptake system of *Aspergillus fumigatus* mediated by PacC under neutral, zinc-limiting conditions. *Int Microbiol* **12**: 39-47.
- Amich, J., R. Vicentefranqueira, F. Leal and J. A. Calera, (2010) *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc-homeostasis system encoded by the *zrfC-aspf2* genes. *Eukaryot Cell*.
- Auld, D. S., (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **14**: 271-313.
- Balaji, R. V. and R. A. Colvin, (2005) A proton-dependent zinc uptake in PC12 cells. *Neurochem Res* **30**: 171-176.
- Balloy, V., M. Huerre, J. P. Latgé and M. Chignard, (2005) Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **73**: 494-503.
- Barret, A. J., C. R. Cantor, C. Liebecq, G. P. Moss, W. Saenger, N. Sharon, K. F. Tipton, P. Venetianer and Vliegenthart, J.F.G., (1992) Enzyme nomenclature. In: *Academic Press, New York*, p. 5-22.
- Bignell, E., S. Negrete-Urtasun, A. M. Calcagno, K. Haynes, H. N. Arst, Jr. and T. Rogers, (2005) The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* **55**: 1072-1084.
- Bird, A. J., K. McCall, M. Kramer, E. Blankman, D. R. Winge and D. J. Eide, (2003) Zinc fingers can act as Zn^{2+} sensors to regulate transcriptional activation domain function. *Embo J* **22**: 5137-5146.
- Bird, A. J., E. Blankman, D. J. Stillman, D. J. Eide and D. R. Winge, (2004) The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2. *Embo J* **23**: 1123-1132.
- Boch, A., A. Trampczynska, C. Simm, N. Taudte, U. Kramer and S. Clemens, (2008) Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance. *FEMS Yeast Res* **8**: 883-896.
- Bonnett, C. R., E. J. Cornish, A. G. Harmsen and J. B. Burritt, (2006) Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immunity* **74**: 6528-6539.
- Bullen, J. J., H. J. Rogers, P. B. Spalding and C. G. Ward, (2006) Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *J Med Microbiol* **55**: 251-258.

- Calera, J. A. and H. Hass, (2009) Cations (Zn, Fe).In: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. J.P. Latgé and Steinbach, W.J. (eds). Washington DC: ASM press, p. 107-129.
- Calera, J. A., M. C. Ovejero, R. Lopez-Medrano, M. Segurado, P. Puente and F. Leal, (1997) Characterization of the *Aspergillus nidulans aspnd1* gene demonstrates that the ASPND1 antigen, which it encodes, and several *Aspergillus fumigatus* immunodominant antigens belong to the same family. *Infect Immunity* **65**: 1335-1344.
- Casadevall, A. and L. Pirofski, (2001) Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* **184**: 337-344.
- Coleman, J. E., (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* **61**: 897-946.
- Colvin, R. A., N. Davis, R. W. Nipper and P. A. Carter, (2000) Evidence for a zinc/proton antiporter in rat brain. *Neurochem Int* **36**: 539-547.
- Chimienti, F., S. Devergnas, A. Favier and M. Seve, (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* **53**: 2330-2337.
- d'Enfert, C., (1996) Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Curr Genet* **30**: 76-82.
- Dainty, S. J., C. A. Kennedy, S. Watt, J. Bahler and S. K. Whitehall, (2008) Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency. *Eukaryot cell* **7**: 454-464.
- Del Bono, V., M. Mikulska and C. Viscoli, (2008) Invasive aspergillosis: diagnosis, prophylaxis and treatment. *Curr Opin Hematol* **15**: 586-593.
- Devirgiliis, C., C. Murgia, G. Danscher and G. Perozzi, (2004) Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 58-64.
- Dufner-Beattie, J., S. J. Langmade, F. Wang, D. Eide and G. K. Andrews, (2003) Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J Biol Chem* **278**: 50142-50150.
- Eide, D. J., (2003) Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* **133**: 1532S-1535S.
- Eide, D. J., (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 711-722.
- Eide, D. J., (2009) Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**: 18565-18569.
- Ellis, C. D., C. W. Macdiarmid and D. J. Eide, (2005) Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J Biol Chem* **280**: 28811-28818.
- Espeso, E. A., T. Roncal, E. Díez, L. Rainbow, E. Bignell, J. Alvaro, T. Suárez, S. H. Denison, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva, (2000) On how a

- transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *Embo J* **19**: 719-728.
- Espeso, E. A., J. Tilburn, L. Sánchez-Pulido, C. V. Brown, A. Valencia, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva, (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* **274**: 466-480.
- Ford, S. and L. Friedman, (1967) Experimental study of the pathogenicity of aspergilli for mice. *J Bacteriol* **94**: 928-933.
- Gaither, L. A. and D. J. Eide, (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* **14**: 251-270.
- Gifford, A. H., J. R. Klippenstein and M. M. Moore, (2002) Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **70**: 19-26.
- Gitan, R. S., H. Luo, J. Rodgers, M. Broderius and D. Eide, (1998) Zinc-induced inactivation of the yeast *ZRT1* zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**: 28617-28624.
- Gitan, R. S., M. Shababi, M. Kramer and D. J. Eide, (2003) A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* **278**: 39558-39564.
- Grocott, R. G., (1955) A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol* **25**: 975-979.
- Grosjean, P. and R. Weber, (2007) Fungus balls of the paranasal sinuses: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **264**: 461-470.
- Hachem, R., P. Bahna, H. Hanna, L. C. Stephens and I. Raad, (2006) EDTA as an adjunct antifungal agent for invasive pulmonary aspergillosis in a rodent model. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1823-1827.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Herbig, A., A. J. Bird, S. Swierczek, K. McCall, M. Mooney, C. Y. Wu, D. R. Winge and D. J. Eide, (2005) Zap1 activation domain 1 and its role in controlling gene expression in response to cellular zinc status. *Mol Microbiol* **57**: 834-846.
- Herbrecht, R., D. W. Denning, T. F. Patterson, J. E. Bennett, R. E. Greene, J. W. Oestmann, W. V. Kern, K. A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. H. Rubin, J. R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. H. Chandrasekar, M. R. Hodges, H. T. Schlamm, P. F. Troke and B. de Pauw, (2002) Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* **347**: 408-415.
- Herranz, S., J. M. Rodríguez, H. J. Bussink, J. C. Sánchez-Ferrero, H. N. Arst, Jr., M. A. Peñalva and O. Vincent, (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **102**: 12141-12146.
- Hervás-Aguilar, A., J. M. Rodríguez, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva, (2007) Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing

- of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem* **282**: 34735-34747.
- Hissen, A. H., J. M. Chow, L. J. Pinto and M. M. Moore, (2004) Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect Immun* **72**: 1402-1408.
- Hohl, T. M. and M. Feldmesser, (2007) *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot cell* **6**: 1953-1963.
- Hortschansky, P., M. Eisendle, Q. Al-Abdallah, A. D. Schmidt, S. Bergmann, M. Thon, O. Kniemeyer, B. Abt, B. Seeber, E. R. Werner, M. Kato, A. A. Brakhage and H. Haas, (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *Embo J* **26**: 3157-3168.
- Huppert, M., D. J. Oliver and S. H. Sun, (1978) Combined methenamine-silver nitrate and hematoxylin & eosin stain for fungi in tissues. *J Clin Microbiol* **8**: 598-603.
- Iyengar, V. and J. Woittiez, (1988) Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. *Clin Chem* **34**: 474-481.
- Jackson, K. A., R. A. Valentine, L. J. Coneyworth, J. C. Mathers and D. Ford, (2008) Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans* **36**: 1262-1266.
- Jensen, L. T., M. Ajua-Alemanji and V. C. Culotta, (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by *PHO84* also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 42036-42040.
- Jung, W. H., G. Hu, W. Kuo and J. W. Kronstad, (2009) Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot cell* **8**: 1511-1520.
- Kaim, W. and B. Schwederski, (1994) Zinc structural and gene-regulatory functions and the enzymatic catalysis of hidrolisis or condensation reactions. In: Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life. An introduction and guide, Wiley & Sons, Chichester, **p.** 242-266
- Kambe, T., Y. Yamaguchi-Iwai, R. Sasaki and M. Nagao, (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci* **61**: 49-68.
- Keller, G., A. Bird and D. R. Winge, (2005) Independent metalloregulation of Ace1 and Mac1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot cell* **4**: 1863-1871.
- Kennedy, J. A. and G. A. Millikan, (1938) A micro blood volume method using a blue dye and photocell. *J Physiol* **93**: 276-284.
- Kim, M. J., M. Kil, J. H. Jung and J. Kim, (2008) Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* **18**: 242-247.
- Kiranmayi, P., A. Tiwari, K. P. Sagar, A. Haritha and P. Maruthi Mohan, (2009) Functional characterization of tzn1 and tzn2-zinc transporter genes in *Neurospora crassa*. *Biometals* **22**: 411-420.

- Klont, R. R., M. A. Mennink-Kersten and P. E. Verweij, (2004) Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* **39**: 1467-1474.
- Kumanovics, A., K. E. Poruk, K. A. Osborn, D. M. Ward and J. Kaplan, (2006) *YKE4* (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 22566-22574.
- Laggner, H., K. Phillipp and H. Goldenberg, (2006) Free zinc inhibits transport of vitamin C in differentiated HL-60 cells during respiratory burst. *Free Radic Biol Med* **40**: 436-443.
- Laity, J. H. and G. K. Andrews, (2007) Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys* **463**: 201-210.
- Lamb, T. M. and A. P. Mitchell, (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 677-686.
- Lamb, T. M., W. Xu, A. Diamond and A. P. Mitchell, (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* **276**: 1850-1856.
- Lambou, K., C. Lamarre, R. Beau, N. Dufour and J. P. Latgé, (2010) Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*.
- Latgé, J. P., (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**: 310-350.
- Latgé, J. P., (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**: 382-389.
- Latgé, J. P., (2003) *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist* **17**: 56-61.
- Latgé, J. P. and R. Calderone, (2002) Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. *Curr Opin Microbiol* **5**: 355-358.
- Li, W. and A. P. Mitchell, (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**: 63-73.
- Lichten, L. A. and R. J. Cousins, (2009) Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* **29**: 153-176.
- MacDiarmid, C. W., L. A. Gaither and D. Eide, (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**: 2845-2855.
- MacDiarmid, C. W., M. A. Milanick and D. J. Eide, (2003) Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J Biol Chem* **278**: 15065-15072.
- Maret, W., C. A. Yetman and L. Jiang, (2001) Enzyme regulation by reversible zinc inhibition: glycerol phosphate dehydrogenase as an example. *Chem Biol Interact* **130-132**: 891-901.

- Martchenko, M., A. M. Alarco, D. Harcus and M. Whiteway, (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol Biol Cell* **15**: 456-467.
- Martínez, C. E. and H. L. Motto, (2000) Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ Pollut* **107**: 153-158.
- Matthews, T. M. and C. Webb, (1991) Culture systems. In: *Saccharomyces*. M. F. Tuite and S. G. Oliver (eds) Plenum Press, New York. vol. 4, p. 249-289.
- Mengoli, C., M. Cruciani, R. A. Barnes, J. Loeffler and J. P. Donnelly, (2009) Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **9**: 89-96.
- Mingot, J. M., E. A. Espeso, E. Díez and M. A. Peñalva, (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* **21**: 1688-1699.
- Mingot, J. M., J. Tilburn, E. Díez, E. Bignell, M. Orejas, D. A. Widdick, S. Sarkar, C. V. Brown, M. X. Caddick, E. A. Espeso, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva, (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol Cell Biol* **19**: 1390-1400.
- Minn, Y., E. Brummer and D. A. Stevens, (1997) Effect of iron on fluconazole activity against *Candida albicans* in presence of human serum or monocyte-derived macrophages. *Mycopathologia* **138**: 29-35.
- Montanini, B., D. Blaudez, S. Jeandroz, D. Sanders and M. Chalot, (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics* **8**: 107.
- Montejo, M., (2002) Invasive infection by *Aspergillus* and other filamentous fungi in solid organ trasplant recipients. *Rev Iberoam Micol* **19**: 9-12.
- Moreno, M. A., J. Amich, R. Vicente-franqueira, F. Leal and J. A. Calera, (2007a) Culture conditions for zinc- and pH-regulated gene expression studies in *Aspergillus fumigatus*. *Int Microbiol* **10**: 187-192.
- Moreno, M. A., O. Ibrahim-Granet, R. Vicente-franqueira, J. Amich, P. Ave, F. Leal, J. P. Latgé and J. A. Calera, (2007b) The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* **64**: 1182-1197.
- Muñoz, P., J. Guinea and E. Bouza, (2006) Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects. *Clin Microbiol Infect* **12**: 24-39.
- Negrete-Urtasun, S., W. Reiter, E. Díez, S. H. Denison, J. Tilburn, E. A. Espeso, M. A. Peñalva and H. N. Arst, Jr., (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol Microbiol* **33**: 994-1003.
- Nierman, W. C., A. Pain, M. J. Anderson, J. R. Wortman, H. S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, K. Abe, D. B. Archer, C. Bermejo, J. Bennett, P. Bowyer, D. Chen, M. Collins, R. Coulsen, R. Davies, P. S. Dyer, M. Farman, N. Fedorova, N. Fedorova,

- T. V. Feldblyum, R. Fischer, N. Fosker, A. Fraser, J. L. Garcia, M. J. García, A. Goble, G. H. Goldman, K. Gomi, S. Griffith-Jones, R. Gwilliam, B. Haas, H. Haas, D. Harris, H. Horiuchi, J. Huang, S. Humphray, J. Jiménez, N. Keller, H. Khouri, K. Kitamoto, T. Kobayashi, S. Konzack, R. Kulkarni, T. Kumagai, A. Lafon, J. P. Latgé, W. Li, A. Lord, C. Lu, W. H. Majoros, G. S. May, B. L. Miller, Y. Mohamoud, M. Molina, M. Monod, I. Mouyna, S. Mulligan, L. Murphy, S. O'Neil, I. Paulsen, M. A. Peñalva, M. Perteu, C. Price, B. L. Pritchard, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, N. Rawlins, M. A. Rajandream, U. Reichard, H. Renauld, G. D. Robson, S. Rodríguez de Córdoba, J. M. Rodríguez-Pena, C. M. Ronning, S. Rutter, S. L. Salzberg, M. Sánchez, J. C. Sánchez-Ferrero, D. Saunders, K. Seeger, R. Squares, S. Squares, M. Takeuchi, F. Tekaia, G. Turner, C. R. Vázquez de Aldana, J. Weidman, O. White, J. Woodward, J. H. Yu, C. Fraser, J. E. Galagan, K. Asai, M. Machida, N. Hall, B. Barrell and D. W. Denning, (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**: 1151-1156.
- O'Gorman, C. M., H. T. Fuller and P. S. Dyer, (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**: 471-474.
- Obayashi, T., K. Negishi, T. Suzuki and N. Funata, (2008) Reappraisal of the serum (1→3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections, a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* **46**: 1864-1870.
- Ohana, E., E. Hoch, C. Keasar, T. Kambe, O. Yifrach, M. Hershfinkel and I. Sekler, (2009) Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem* **284**: 17677-17686.
- Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva, (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev* **9**: 1622-1632.
- Pagani, A., L. Villarreal, M. Capdevila and S. Atrian, (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* Crs5 Metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. *Mol Microbiol* **63**: 256-269.
- Pagano, L., M. Caira, A. Candoni, M. Offidani, L. Fianchi, B. Martino, D. Pastore, M. Picardi, A. Bonini, A. Chierichini, R. Fanci, C. Caramatti, R. Invernizzi, D. Mattei, M. E. Mitra, L. Melillo, F. Aversa, M. T. Van Lint, P. Falcucci, C. G. Valentini, C. Girmenia and A. Nosari, (2006) The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **91**: 1068-1075.
- Pagella, F., E. Matti, F. De Bernardi, L. Semino, C. Cavanna, P. Marone, C. Farina and P. Castelnovo, (2007) Paranasal sinus fungus ball: diagnosis and management. *Mycoses* **50**: 451-456.
- Palmiter, R. D., (2004) Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **101**: 4918-4923.

- Palmiter, R. D., T. B. Cole, C. J. Quaife and S. D. Findley, (1996) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad U.S.A.* **93**: 14934-14939.
- Papanikolaou, G. and K. Pantopoulos, (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **202**: 199-211.
- Peñalva, M. A. and H. N. Arst, Jr., (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* **58**: 425-451.
- Peñalva, M. A., J. Tilburn, E. Bignell and H. N. Arst, Jr., (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**: 291-300.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema, (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Philippe, B., O. Ibrahim-Granet, M. C. Prevost, M. A. Gougerot-Pocidalo, M. Sánchez Pérez, A. Van der Meeren and J. P. Latgé, (2003) Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun* **71**: 3034-3042.
- Prasad, A. S., (1993) Essentiality and toxicity of zinc. *Scand J Work Environ Health* **19 Suppl 1**: 134-136.
- Prohaska, J. R. and A. A. Gybina, (2004) Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr* **134**: 1003-1006.
- Qiao, W., M. Mooney, A. J. Bird, D. R. Winge and D. J. Eide, (2006) Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET. *Proc Natl Acad U.S.A.* **103**: 8674-8679.
- Ramanan, N. and Y. Wang, (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science (New York, N.Y)* **288**: 1062-1064.
- Rementeria, A., N. López-Molina, A. Ludwig, A. B. Vivanco, J. Bikandi, J. Ponton and J. Garaizar, (2005) Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* **22**: 1-23.
- Rutherford, J. C. and A. J. Bird, (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot cell* **3**: 1-13.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual. *Cold Spring, Cold Spring Harbor laboratory Press*.
- Schaible, U. E. and S. H. Kaufmann, (2004) Iron and microbial infection. *Nature Rev* **2**: 946-953.
- Schrettl, M., E. Bignell, C. Kragl, C. Joechl, T. Rogers, H. N. Arst, Jr., K. Haynes and H. Haas, (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med* **200**: 1213-1219.
- Schrettl, M., H. S. Kim, M. Eisendle, C. Kragl, W. C. Nierman, T. Heinekamp, E. R. Werner, I. Jacobsen, P. Illmer, H. Yi, A. A. Brakhage and H. Haas, (2008) SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **70**: 27-43.
- Schwarz, J., (1982) The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol* **13**: 519-533.

- Segurado, M., R. López-Aragón, J. A. Calera, J. M. Fernández-Ábalos and F. Leal, (1999) Zinc-regulated biosynthesis of immunodominant antigens from *Aspergillus spp.* *Infect Immun* **67**: 2377-2382.
- Senn, L., J. O. Robinson, S. Schmidt, M. Knaup, N. Asahi, S. Satomura, S. Matsuura, B. Duvoisin, J. Bille, T. Calandra and O. Marchetti, (2008) 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* **46**: 878-885.
- Serrano, R., D. Bernal, E. Simon and J. Arino, (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J Biol Chem* **279**: 19698-19704.
- Serrano, R., A. Ruiz, D. Bernal, J. R. Chambers and J. Arino, (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* **46**: 1319-1333.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter, (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Simm, C., B. Lahner, D. Salt, A. LeFurgey, P. Ingram, B. Yandell and D. J. Eide, (2007) *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryot cell* **6**: 1166-1177.
- Singh, N. and D. L. Paterson, (2005) *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* **18**: 44-69.
- Spikes, S., R. Xu, C. K. Nguyen, G. Chamilos, D. P. Kontoyiannis, R. H. Jacobson, D. E. Ejzykowicz, L. Y. Chiang, S. G. Filler and G. S. May, (2008) Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis* **197**: 479-486.
- Stephens-Romero, S. D., A. J. Mednick and M. Feldmesser, (2005) The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun* **73**: 114-125.
- Stergiopoulou, T., J. Meletiadis, E. Roilides, D. E. Kleiner, R. Schaefele, M. Roden, S. Harrington, L. Dad, B. Segal and T. J. Walsh, (2007) Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* **127**: 349-355.
- Stevens, D. A., (2004) Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. *Clin Infect Dis* **38**: 1131-1136.
- Striz, I. and I. Trebichavsky, (2004) Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* **53**: 245-253.
- Sutak, R., E. Lesuisse, J. Tachezy and D. R. Richardson, (2008) Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol* **16**: 261-268.
- Tapiero, H. and K. D. Tew, (2003) Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* **57**: 399-411.

- Tekaia, F. and J. P. Latge, (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol* **8**: 385-392.
- Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Peñalva and H. N. Arst, Jr., (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo J* **14**: 779-790.
- Vicentefranqueira, R., M. A. Moreno, F. Leal and J. A. Calera, (2005) The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot cell* **4**: 837-848.
- Vincent, O., L. Rainbow, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva, (2003) YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* **23**: 1647-1655.
- Von Heijne, G., (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**: 487-494
- Waterman, S. R., M. Hacham, G. Hu, X. Zhu, Y. D. Park, S. Shin, J. Panepinto, T. Valyi-Nagy, C. Beam, S. Husain, N. Singh and P. R. Williamson, (2007) Role of a *CUF1/CTR4* copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **117**: 794-802.
- Waters, B. M. and D. J. Eide, (2002) Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* **277**: 33749-33757.
- Wheat, L. J. and T. J. Walsh, (2008) Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 245-251.
- Wimmer, U., Y. Wang, O. Georgiev and W. Schaffner, (2005) Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res* **33**: 5715-5727.
- Yasmin, S., B. Abt, M. Schrettl, T. A. Moussa, E. R. Werner and H. Haas, (2009) The interplay between iron and zinc metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **46**: 707-713.
- Yokus, B. and U. D. Cakir, (2006) Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle. *Biol Trace Elem Res* **109**: 255-266.
- Zaas, A. K. and B. D. Alexander, (2009) Invasive Pulmonary Aspergillosis. In: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. J.P. Latgé and Steinbach, W.J. (eds). Washington DC: ASM press, **p.** 293-299.
- Zhao, H., E. Butler, J. Rodgers, T. Spizzo, S. Duesterhoeft and D. Eide, (1998) Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the *ZAP1* transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* **273**: 28713-28720.
- Zhao, H. and D. Eide, (1996a) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **93**: 2454-2458.

- Zhao, H. and D. Eide, (1996b) The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 23203-23210.
- Zmeili, O. S. and A. O. Soubani, (2007) Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Qjm* **100**: 317-334.